

SÉRIE A, N° 2614
N° D'ORDRE : 3486

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre VIGNAIS

- 1^{re} THÈSE.** — RECHERCHES SUR LA STRUCTURE BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE
DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE.
- 2^e THÈSE.** — MÉTHODES DE PURIFICATION DE L'EXOTOXINE DIPHTÉRIQUE ET
DE SON ANATOXINE.

Soutenues le 10 juin 1952 devant la Commission d'Examen.

MM. AUBEL *Président.*
WURMSER . . . } *Examineurs.*
MACHEBOEUF . }

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

1953

SÉRIE A, N° 2614
N° d'ORDRE : 3486

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre VIGNAIS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LA STRUCTURE BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE
DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE.

2^e THÈSE. — MÉTHODES DE PURIFICATION DE L'EXOTOXINE DIPHTÉRIQUE ET
DE SON ANATOXINE.

Soutenues le 10 juin 1952 devant la Commission d'Examen.

MM. AUBEL *Président.*
WURMSER . . . } *Examineurs.*
MACHEBOEUF . }

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSERTE, 1

1953

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. A. CHATELET.

PROFESSEURS

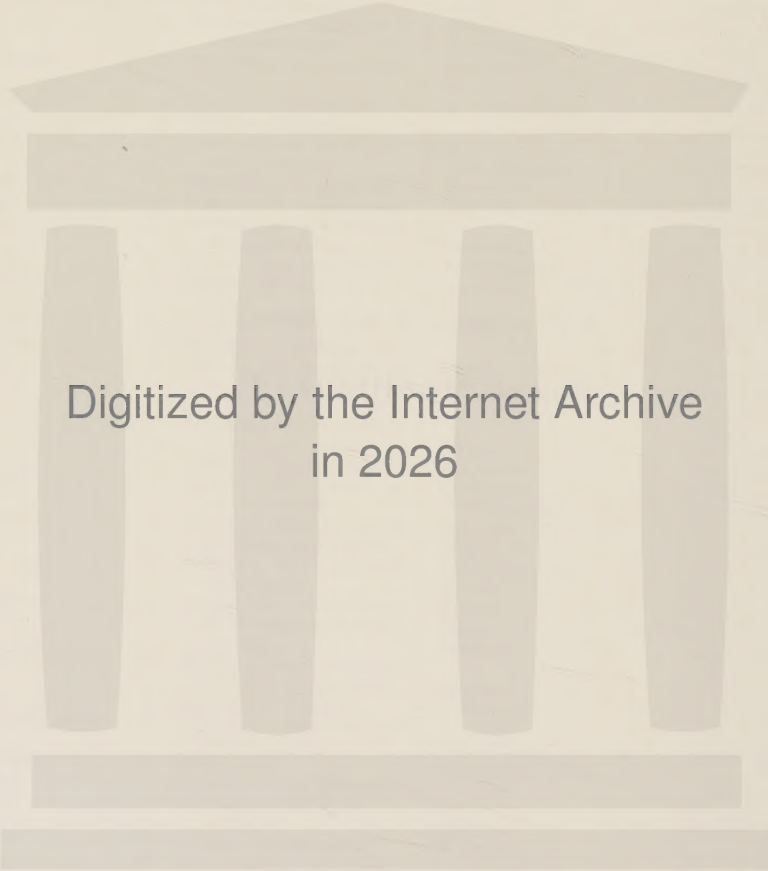
G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	COULOMB	T	Physique du globe.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions.	M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.)
L. LUTAUD	T	Géographie physique et géologie dynamique.	CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
E. DARMOIS	T	Enseignement de physique.	DRACH	T	Zoologie.
Robert LÉVY	T	Physiologie comparée.	KASTLER	T	Physique.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T	Chimie organique.	CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	EPHRUSSI	T	Génétique.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
De BROGLIE	T	Théories physiques.	BAUER	T	Chimie-physique.
JOB	T	Chimie générale.	RIVIERE	T	Géologie (P. C. B.).
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparées.	GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.)
COMBES	T	Physiologie végétale.	LUCAS	T	Physique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	A. THOMAS	T	Evolution des êtres organisés.
PÉRES	T	Mécanique des fluides et applications.	ARNULF	T	Optique appliquée.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	MAX MORAND	T	Physique.
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique.	SOLEILLET	T	Physique.
M. CURIE	T	Physique (P. C. B.).	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
G. RIBAUD	T	Hautes températures.	DANJON	T	Astronomie.
CHAZY	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.	PROMAGEOT	T	Chimie biologique.
CROZE	T	Physique théorique et Physique céleste.	LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.
DUPONT	T	Théories chimiques.	JANET	T	Mathématiques générales.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	PETIT	T	Biologie maritime.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques.	GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.)
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique Mathématique	EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.)
Jacques BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	DE CUGNAC	T	Biologie végétale (P.C.B.)
AUBEL	T	Chimie biologique.	M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie-Physique.
M ^{me} JOLIO-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité.	THELLIER	T	Physique du globe.
PLANTFOL	T	Botanique.	AUDUBERT	T	Electrochimie.
CABANNES	T	Recherches physiques.	L'HERITIER	T	Génétique.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	GRISET	T	Radio Electricité.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
BOULIGAND	T	Applications de l'analyse à la géométrie.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	DUBREIL	T	Mathématiques générales.
WYART	T	Minéralogie.	QUELET	T	Chimie (P.C.B.)
TEISSIER	T	Zoologie.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	CHAMPETIER	T	Chimie appliquée.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.	CUVILLIER	T	Géologie structurale et géologie appliquée.
MONNIER	T	Physiologie générale.	JUNG	T	Petrographie.
PIVETEAU	T	Géologie.	TRILLAT	T	Physique (P.C.B.)
ROCARD	T	Physique.	WIEMANN	T	Chimie (P.C.B.)
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. Supérieure).	LICHNEROWICZ	T	Mathématiques générales.
SCHAEFFER	T	Physiologie des fonctions.	JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.)
LAFFITE	T	Chimie générale.	VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
FAVARD	T	Mécanique générale.	DESTOUCHES	T	Théories physiques.
			M. PRUVOST	T	Géologie.
			AMIEL	T	Chimie (P.C.B.)
			HOCART	T	Minéralogie.
			MACHEBOEUF	T	Microbiologie.
			J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.)
			COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
			MAY	T	Biologie animale (P.C.B.)
			CHOQUET	T	Calcul différentiel.
			FELDMANN	T	Biologie (P.C.B.)
			GUINER	T	Physique (P.C.B.)
			JOST	T	Biologie (P.C.B.)

Secrétaire CH. MONIER.

BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A la mémoire de mon Maître,

MICHEL MACHEBŒUF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

RECHERCHES
SUR
LA STRUCTURE BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE
DE
L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

INTRODUCTION

Parmi les constituants essentiels de la cellule vivante, les protéines tiennent une place primordiale. Le rôle fondamental joué par ces molécules conduit naturellement à poser le problème de leur mode de synthèse. Pour tenter de le résoudre, de nombreuses théories ont été proposées : la réversibilité possible d'une hydrolyse enzymatique de protéine semblait peut-être l'une des plus séduisantes. Aussi les chercheurs accueillirent-ils avec un vif intérêt le travail publié par Bresler en 1947 ; soumettant à des pressions hydrostatiques très élevées des hydrolysats protéiques en présence de leurs enzymes, Bresler prétendait parvenir à déplacer l'équilibre de la réaction dans le sens de la synthèse [1, 2]. Ces expériences reprises à l'Institut Pasteur par Macheboëuf et coll. [3] fournirent des résultats entièrement différents : aucun déplacement de l'équilibre enzymatique ne fut constaté.

L'expérimentation fut renouvelée en fonction de la variation des différents facteurs (pH, durée de pression, pureté de l'enzyme). Les résultats s'avèrent toujours négatifs.

C'est alors que sur l'initiative de notre maître, M. Macheboëuf,

nous avons été amené à étudier l'influence d'un nouveau facteur : l'acide ribonucléique. Sa présence à l'état d'impureté risquait d'avoir influencé les résultats de Bresler. Nous avons recherché l'action des hautes pressions sur l'acide nucléique de levure avec ou sans ribonucléase et sur les hydrolysats de protéines en présence d'acide nucléique.

Ces travaux nécessitaient cependant une étude préalable de la structure de l'acide ribonucléique, et plus particulièrement du mode d'action de la ribonucléase dans des conditions normales de pression. C'est après ces essais préliminaires que nous avons abordé le problème de l'influence des pressions hydrostatiques élevées et de leur rôle éventuel dans une synthèse enzymatique. Certaines modifications de structure subies par des hydrolysats d'acide ribonucléique après compression, ont pu, un instant, en imposer pour une synthèse ; nous avons démontré qu'en fait il n'existait pas de réversibilité d'hydrolyse ni pour l'acide ribonucléique, ni pour des protéines même en présence d'acide nucléique.

Ces recherches n'ont donc pas apporté d'arguments en faveur des théories de Bresler. Cependant, elles nous ont permis d'élucider quelques points de la cinétique enzymatique de systèmes soumis aux hautes pressions. Elles étaient d'autre part nécessaires et répondaient dans une large mesure aux idées qu'on se fait actuellement des acides nucléiques. Nombreuses sont en effet les hypothèses qui assignent à ces substances une fonction essentielle dans les phénomènes fondamentaux de la vie.

Dans une revue générale, nous examinerons ces hypothèses ; nous discuterons les faits qui leur servent d'arguments ; nous verrons enfin, comment les données actuelles que l'on possède sur la structure physico-chimique des acides ribonucléiques permettent d'entrevoir le comportement biologique de ces macromolécules.

RÔLE BIOLOGIQUE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES.

Il est un fait général que là où se fait une synthèse intense de substance vivante, existe une proportion très élevée d'acide ribonucléique [4, 5, 6] :

1° *Dans les tissus en voie de croissance :*

Disques imaginaires des larves de drosophiles ;

Dendrites des neurones.

2° *Dans les cellules en voie de multiplication très active :*

Tissus tumoraux ou embryonnaires ;

Bactéries, virus, levures ;

Bourgeons de régénération ;

Couche basale de la peau, etc.

3° Dans les tissus à activité ségrégative :

Glandes exocrines : glandes séricigènes du ver à soie ; cellules principales de la muqueuse gastrique ;

Glande endo-exocrine : pancréas.

Toutefois ces constatations demandent réflexion. Les acides nucléiques existent bien, surtout là où s'élaborent des processus de synthèses ; mais sont-ils les agents réels de cette synthèse ou bien des témoins plus ou moins indifférents ?

En fait, de nombreuses expériences permettent d'affirmer leur rôle effectif. Ainsi après excitation hormonale [7, 8] de glandes à sécrétion interne, la teneur en acide ribonucléique des cellules glandulaires augmente notablement : stimulation de la sécrétion hypophysaire par extrait de glande pituitaire, stimulation de la sécrétion ovarienne par injection d'œstrone.

D'autre part, des relations quantitatives entre la variation des acides nucléiques et la synthèse des protéines ont pu être établies.

Thorell sur les hématies [9], Malmgreen [40] sur les bactéries ont constaté un rapport très étroit entre ces deux ordres de phénomènes : la formation des acides nucléiques dans la cellule précéderait celle des protéines.

Dans les ultravirus, la partie nucléique semble posséder un rôle capital dans les processus d'autoreproduction. Par action de la ribonucléase sur la mosaïque du tabac, il n'y a pas d'altération de la structure morphologique, mais un arrêt complet des processus de multiplication [41].

Schramm [42] en faisant agir une nucléotidase sur le même virus a pu détruire spécifiquement la copule nucléique et obtenir la protéine purifiée. Cette dernière est encore cristallisable ; son poids moléculaire est très peu différent de celui de la nucléoprotéine initiale. Mais elle a perdu tout pouvoir virulent. Par contre, la virulence peut être conservée intacte après action modérée de certains réactifs chimiques sur la fraction protéique. Schramm et Muller [43], puis Miller et Stanley [44] ont réussi l'acétylation par le cétène de la nucléoprotéine virale : une courte acétylation bloque les radicaux aminés libres de la lysine, mais laisse intacte la virulence. Bien plus, après inoculation au tabac du virus acétylé, se déclenche la maladie typique ; le nouveau virus isolé se trouve sous sa forme naturelle non acétylé.

Toujours dans le cas de la mosaïque du tabac, l'isocyanate de phényle tout en agissant sur les radicaux aminés de la fraction protéique de la molécule n'altère en rien sa virulence [45]. De tels faits démontrent les fonctions capitales que jouent les acides nucléiques dans les processus d'autoreproduction.

Toutefois, ces fonctions si importantes de la copule nucléinique des nucléoprotéines, nécessitent une parfaite intégrité des liaisons

entre acide nucléique et protéine, ainsi que l'ont montré Basset, Gratia, Macheboeuf et Manil [16]. Ces auteurs, travaillant sur la mosaïque du tabac ont en effet constaté que le virus résistait à des pressions de 6 000 kg/cm² mais était inactivé à 8 000 kg/cm² en quarante-cinq minutes à la température ordinaire. De plus, il n'était plus cristallisable et ne réagissait plus avec l'antisérum spécifique. De tels phénomènes laissaient entrevoir une dénaturation profonde de la partie protéique du virus.

Lauffer et Dow confirmèrent ces résultats [17]. Ils étudièrent en particulier la proportion de protéine dénaturée sous forme de gel en fonction de la pression et montrèrent que ce coagulum était privé de phosphore mais restait riche en azote : le gel représentait donc uniquement la partie protéique du virus. Une scission s'était produite entre l'acide nucléique et la protéine, suivie de la dénaturation de cette protéine et d'une inactivation totale du virus.

D'un point de vue différent, nous verrons de quelle façon les acides nucléiques peuvent intervenir dans les mutations dirigées. Ces mutations furent obtenues pour la première fois sur le Pneumocoque par Griffiths en 1928 [18]. Injectant à des Souris une souche « Rough » non virulente de Pneumocoque et un extrait de souche « Smooth », préalablement tuée par la chaleur, il vit apparaître et se développer une infection typique : les Souris mouraient et on pouvait isoler par hémoculture l'agent virulent ; il s'agissait de Pneumocoque de la forme « Smooth ».

En 1931, Dawson et Sia [19, 20] mettaient en évidence le phénomène *in vitro*. Ils réussissaient la transformation de Pneumocoques R (provenant de S II) en Pneumocoques S III, par simple addition d'extrait de S III.

En 1944, Avery, MacLeod et McCarty apportaient à ce phénomène une explication chimique [21]. Ils isolèrent du Pneumocoque S III un acide désoxyribonucléique purifié de toute trace de protéine et de substance étrangère. Cet acide nucléique de poids moléculaire d'environ 500 000 était actif à l'état de trace et induisait chez les Pneumocoques de forme R la transformation de toute une série de processus biochimiques et par suite l'apparition des caractères spécifiques de la forme S III. Ces caractères, fait essentiel, se transmettaient aux cellules filles : il s'agissait donc d'un exemple caractéristique d'hérédité des caractères acquis.

À côté des acides nucléiques polymérisés, les oligonucléotides et même de simples mononucléotides peuvent être des facteurs essentiels de processus biologiques : on les rencontre dans des composés chimiques de première importance (Ferments de Warburg et de von Euler, adénosine di- ou triphosphate, etc.).

Ils semblent même susceptibles d'influencer la croissance des tissus ; Barker, Gulland et Parsons [22] ont étudié l'action de mononucléotides d'A.R.N. de levure sur le développement de tumeurs greffées chez la Souris [23] :

Les acides guanylique et adénylique retardent la croissance de la tumeur ;

Il n'y a pas d'effet notable de l'acide cytidylique ;

Quant à l'acide uridylique, il accélère nettement la poussée néoplasique.

D'un tel ordre de faits ne doit-on pas rapprocher l'importance considérable des mononucléotides dans le métabolisme bactérien. Nous ne ferons que citer l'action spécifique remarquable de la pénicilline sur le catabolisme nucléotidique, inhibant par le fait même toute prolifération microbienne [24, 25, 26].

Park et Johnson ont même mis en évidence l'existence de liaison entre un simple mononucléotide et un polypeptide. Il s'agissait de l'acide uridylique uni au polypeptide par l'intermédiaire d'une molécule d'osamine acétylée [27].

Ces faits constituent autant d'arguments qui prouvent que les acides nucléiques ne sont pas de simples témoins, mais des agents très actifs des processus vitaux.

Pour tenter d'interpréter ces résultats et pour rendre compte de la participation des acides nucléiques à la synthèse des protéines, de nombreuses théories ont été proposées.

Suivant Friedrich-Freska [28], il existerait une attraction entre les charges de signes opposés des fonctions acides de l'A.R.N. et des fonctions aminées libres des protéines basiques ; il faudrait alors supposer que l'emplacement de ces bases soit spécifique d'une protéine donnée.

Pour Rondoni [29], vis-à-vis des acides aminés d'une molécule de nucléoprotéine se disposeraient des acides aminés homologues. Par la suite, des protéases spécifiques uniraient ces acides et réaliseraient la synthèse d'une protéine, exactement identique à celle de la nucléoprotéine modèle.

D'après Chantrenne [30], les acides nucléiques entreraient en combinaison avec les protéines synthétisées par les protéases. Ces combinaisons sont ainsi écartées de la réaction et l'équilibre enzymatique se trouve déplacé vers la synthèse.

Orstrom [31] admet que les groupes aminés des bases nucléiques réagissent avec les acides gras cétoniques et fournissent ainsi des acides aminés.

Ostern [32] pense que les acides nucléiques constituent une source de coenzymes. En effet, l'acide adénylique de provenance ribonucléique, en présence de phosphates minéraux et sous l'influence de la levure, se transforme en adénosine 5-phosphate.

Par ailleurs, un fait particulièrement curieux vient d'être signalé. L'A.R.N. de levure serait doué d'une activité peptidase entre certaines limites de pH. On a même montré que la cystéinoglycine, enzyme, qui intervient dans l'hydrolyse de glutathion, est un polynucléotide [33]. Ainsi se trouve renforcée l'idée d'une intervention des acides nucléiques dans le métabolisme protéique.

En somme, les différentes hypothèses qui tentent d'expliquer cette intervention peuvent se grouper en deux grandes catégories : les unes placent les acides nucléiques comme des donneurs d'énergie, les autres comme un modèle sur lequel se disposent et s'ordonnent les différents acides aminés de la future molécule protéique. Cette dernière hypothèse rendrait compte par exemple de la correspondance entre la période intramoléculaire de l'acide thymonucléique et de polypeptides étirés tels que la β -myosine.

In vivo, à l'étage de la cellule, l'importance des acides nucléiques trouve une confirmation. On sait que, dans le noyau cellulaire, se trouvent à la fois des acides ribo- et désoxyribonucléiques ; dans le cytoplasme uniquement de l'acide ribonucléique.

Casperson [34, 35] considère le noyau, et spécialement la chromatine, comme un centre de synthèse des protéines. Les chromosomes sont généralement formés d'une partie euchromatique (A.D.N.) et d'une partie hétérochromatique (A.R.N. et A.D.N.). L'euchromatine serait à la fois un support de gènes et un lieu de synthèse de protéines supérieures telles que les globulines.

L'hétérochromatine contrôlerait le métabolisme de l'A.R.N. et l'élaboration d'histones.

C'est au niveau du nucléole, particulièrement riche en A.R.N., que se ferait la synthèse de ribonucléohistones. Ces dernières migreraient au niveau de la membrane nucléaire et deviendraient là les agents actifs de la synthèse des protéines cytoplasmiques.

Quant à Brachet [4], il pense que le cycle proposé par Casperson peut très bien se concevoir suivant une voie inverse. Aussi attribue-t-il un rôle essentiel aux organismes intracytoplasmiques et aux microsomes en particulier. Ces microsomes sont en effet le support de nombreux enzymes. Ils contiennent de grandes quantités d'A.R.N. On y retrouve liées de façon très étroite les protéines spécifiques de la cellule : hémoglobine pour les hématies, hormones pour les glandes à sécrétion interne. Ils possèdent des analogies morphologiques et chimiques avec certaines particules nucléoprotéiques hautement infectieuses, douées d'auto-reproduction, isolées de maladies à virus (grasseur du ver à soie, par exemple).

En fait, malgré les divergences de leurs théories, Brachet et Caspersen admettent l'un et l'autre l'importance des acides ribonucléiques dans la biogénèse des protéines.

Tous les arguments biologiques en faveur du rôle que jouent ces macromolécules dans les synthèses *in vivo*, s'éclairent et prennent une valeur nouvelle à la lueur des récentes acquisitions biochimiques. Parmi les acides ribonucléiques, l'A.R.N. de levure a fait l'objet des études les plus nombreuses et il est possible, à l'heure actuelle, de se faire une idée de sa structure.

STRUCTURE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Historique.

Les acides ribonucléiques sont des macromolécules hautement polymérisées. Ils possèdent comme constituants : de l'acide phosphorique, du ribose et des bases azotées de quatre types différents : deux bases puriques, l'adénine et la guanine ; deux bases pyrimidiques, l'uracile et la cytosine.

D'après les théories classiques, chaque molécule de ribose est unie à une base par une liaison osidique et à un acide phosphorique par une liaison ester. L'ensemble base-ribose-acide phosphorique forme un mononucléotide.

On admet que la molécule d'acide ribonucléique est constituée par tout un ensemble de nucléotides reliés les uns aux autres. Le degré de polymérisation peut être extrêmement élevé, le poids moléculaire est en général de l'ordre de 30 000 [36] ; cependant, certains auteurs ont réussi à isoler du foie de veau ou de rat des acides pentose-nucléiques dont le poids moléculaire serait de 300 000 [37].

En fait, les techniques actuelles d'extraction des A.R.N. ne permettent pas d'obtenir des solutions très homogènes quant au poids moléculaire. C'est pourquoi les recherches sur la structure générale et les caractéristiques physico-chimiques de la macromolécule d'acide nucléique se heurtent encore à de nombreuses difficultés.

Une voie beaucoup plus fructueuse est celle de l'étude analytique. Des résultats, d'ailleurs nombreux et intéressants, sont venus couronner ces investigations. Nous donnerons, ici, un aperçu d'ensemble de la question après un bref rappel historique.

I. Hypothèse du tétranucléotide : arguments et critiques.

Dès 1909, Levene [38] avait conçu l'hypothèse d'un élément de base : le tétranucléotide formé des quatre différents nucléotides et se répétant identique à lui-même tout au long de la molécule nucléique. En 1918, il obtint [39] les mononucléotides à l'état cristallisé sous forme de sel de brucine.

Takahashi [40, 41, 42], en 1931, donna le schéma d'un tétranucléotide cyclique. Il appuyait ses conclusions sur l'action des mono- et diphosphoestérases retirées du venin de serpent *Trimeresurus flavoridis* : chacune des diastases à l'exclusion de l'autre était inactive ; associées elles possédaient, au contraire, une action hydrolysante efficace. Toutefois, ces résultats ne purent être reproduits par Klein et Rossi [43].

En 1942, Bredereck [44] réussit à isoler par hydrolyse ménagée un corps qui possédait les caractéristiques d'un tétranucléotide (poids moléculaire 1 200 d'après la méthode de diffusion, existence de 5 fonctions acides libres).

Les travaux d'Allen et Eiler [45] semblèrent confirmer ces faits ; en comparant l'électrotitration d'un acide ribonucléique témoin avec celle d'un hydrolysate enzymatique (ribonucléase), ces auteurs conclurent qu'une fonction acide pour 4 mononucléotides était libérée au cours de l'hydrolyse.

Gregoire [46, 47] opérant sur de l'acide ribonucléique extrait de larves de *Calliphora* arriva à des conclusions identiques.

On pouvait donc envisager l'acide ribonucléique comme étant formé d'un enchaînement de tétranucléotides, chaque tétranucléotide possédant 2 nucléotides à base purique et 2 nucléotides à base pyrimidique.

Les recherches de ces dernières années ont démontré, en fait, que la théorie du tétranucléotide était erronée. Rappelons les expériences primordiales de Chargaff et Visser [48] : grâce à la chromatographie quantitative sur papier, ces auteurs purent établir pour un A.R.N. de levure les proportions molaires de bases suivantes :

{	Adénine	3,2
	Guanine	3,1
	Cytosine	3
	Uracile	4

Ces proportions sont d'ailleurs variables suivant les acides nucléiques.

L'argument de base en faveur de l'existence du tétranucléotide restait son isolement. Bredereck prétendait l'avoir réussi. En 1944, Gulland [49] s'attaqua à ce problème. Il suivit la technique de Bredereck : le corps obtenu, désaminé par nitrosation, exigeait pour sa neutralisation 5 équivalents-soude (contrôle à la phénolphaléine). Or, un tétranucléotide, dans ces conditions, aurait dû être hexacide (le radical OH de la xanthine ayant un pH de 7 à 8). La préparation de Bredereck contenait donc un ensemble de composés assez mal définis.

Il ne faut donc plus considérer le tétranucléotide comme l'unité fondamentale de la molécule de l'acide nucléique. Seuls les mononucléotides en sont les chaînons élémentaires.

Si ces mononucléotides sont des composés chimiques bien définis et assez stables il n'en est pas de même de la macromolécule d'A.R.N.

Sa caractéristique essentielle est, en effet, son instabilité. Delcambre [50] a montré qu'en alcalinisant pendant quelque temps à pH 10,5 une solution d'A.R.N. il était possible de provoquer des changements dans la structure de la molécule facilement décelables par les données de l'électrotitration. D'ailleurs, d'après Vandendriesche [51] des pH 9 se ferait une hydrolyse spontanée avec libération éventuelle de nucléotides.

L'idée qu'on se fait actuellement de l'A.R.N. est celle d'une molécule complexe très fragile dont la spécificité biologique tient à la fois à sa structure spatiale mais aussi à la séquence des nucléotides c'est-à-dire à sa structure primaire. C'est en particulier grâce à l'analyse des produits d'hydrolyse et des fonctions chimiques libérés au cours de cette hydrolyse que l'on peut espérer connaître le mode de séquence des nucléotides et la nature des liaisons qui les unissent.

II. — Séquence des nucléotides.

A. — NATURE DES PRODUITS RÉSULTANT D'UNE HYDROLYSE PARTIELLE ALCALINE OU ACIDE.

En 1917, Jones et Read, par action de l'ammoniaque sur l'acide ribonucléique isolèrent un dinucléotide (acide uridylique-acide cytidilique) [52, 53].

Bredereck en 1936, caractérisa également un dinucléotide d'acides uridylique et guanylique [54].

Falconer devait retrouver ce composé quelques années plus tard [55].

Plus récemment, Bredereck en 1941 [56], hydrolysant de l'acide ribonucléique de levure à 100° C, par de la pyridine diluée, constata que l'acide guanylique était le premier nucléotide à apparaître, suivi très rapidement par l'acide adénylique. S'appuyant sur l'hypothèse du tétranucléotide, il proposa les schémas suivants :

Guanine-adénine-uracyle-cytosine.

Guanine-adénine-cytosine-uracyle.

Guanine-uracyle-cytosine-adénine.

Cependant il n'est pas impossible que le traitement par la pyridine ait fait apparaître à côté de nucléotides, des produits de dégradation ultérieure, tels que des nucléosides [57].

D'ailleurs, grâce aux techniques de chromatographie on a pu déceler dans les hydrolysats d'A.R.N., au moins 7 substances [58].

Nous avons déjà vu qu'une hydrolyse alcaline légère (50° C pendant dix minutes), avait permis à Bredereck [44], d'isoler des oligonucléotides possédant les caractéristiques des tétranucléotides, mais nous savons les réserves apportées à ce sujet par Gulland [48].

Comparativement aux alcalis, les acides se révèlent comme des agents hydrolysants beaucoup plus actifs vis-à-vis de l'A.R.N.

Agissant au-dessus de 100°, ils sont susceptibles de fournir des purines, des pyrimidines ainsi que des nucléosides pyrimidiques. Les purines peuvent être désaminées et même décomposées en glyocolle, en acide formique, en ammoniaque et en anhydride carbonique [59, 60]. Les hydrolyses acides moins poussées donnent soit des nucléotides puriques et pyrimidiques (hydrolyse par HCl N pendant dix minutes à 60° C) [61], soit des nucléotides pyrimidiques et des bases puriques (hydrolyse par HCl N pendant une heure à 100° C) [62].

En résumé, les hydrolyses, soit alcalines, soit acides, libèrent suivant les cas :

Des oligonucléotides.

Des mononucléotides.

Des nucléosides.

Des bases puriques et pyrimidiques.

Souvent un même agent hydrolytique peut faire apparaître toute une gamme de produits. Ainsi la dégradation de l'A.R.N., ne s'effectue pas selon un processus régulier et bien défini. *Ce fait constitue un argument en faveur de liaisons internucléotidiques de force et de nature différentes.*

B. — HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

Les premières recherches sur l'hydrolyse enzymatique remontent au début du siècle, époque à laquelle Milroy mit en évidence dans les tissus, l'existence d'une substance capable de dégrader les acides nucléiques. Cette diastase hydrolysante fut caractérisée dans les sérums sanguins par Pighini [63] et dans le suc gastro-intestinal par Levène [64].

Thannhauser [65], en 1914, en faisant agir une préparation pancréatique sur de l'acide nucléique de levure, avait obtenu un trinucéotide guanyladénylcytidilique. Toutefois, selon Levène [66] il ne s'agissait que de produits plus ou moins dégradés.

Ce n'est qu'à partir du moment où la ribonucléase put être obtenue pure à l'état cristallisée [67, 68], que l'étude de son mode d'action prit de l'intérêt.

Longtemps, se pose la question de savoir où s'arrêtait l'action dépolymérisante de la ribonucléase : au stade d'oligonucléotides

ou bien à celui de mononucléotides. Pour caractériser ces mononucléotides Schmidt et Levène avaient proposé les critères suivants [69] :

— La dialyse à travers la cellophane.

— L'abaissement du point de congélation.

— Le fait de précipiter par le réactif de MacFeyden à l'acétate d'uranyle [70] (ce dernier test permet la différenciation avec les nucléosides ou les produits de dégradation ultérieure).

Or dans le cas de l'acide ribonucléique de levure hydrolysé par la ribonucléase, les mêmes auteurs constatèrent que les produits d'hydrolyse enzymatique ne traversaient pas les parois du sac de dialyse et que le point de congélation n'était pas abaissé de façon significative. Il s'agissait donc, non de mononucléotides mais d'oligonucléotides.

Kunitz [68], a publié des conclusions contraires à celles de Levène : les membranes de collodion ou de cellophane seraient perméables aux produits d'hydrolyse ribonucléasique. On peut rapprocher de ces faits les résultats de Loring et de Carpentier qui ont isolé des mononucléotides [71] par l'action de la ribonucléase et ceux de Fisher qui a montré que la taille moyenne des produits dialysables correspondait à celle de dinucléotides [72].

Loring a montré également que des produits d'hydrolyse enzymatique diffusent à travers le collodion [73]. Le taux de passage d'abord très élevé tend vers une limite ; les auteurs pour expliquer ce phénomène ont proposé soit une influence inhibitrice des petits polymères vis-à-vis de la ribonucléase, soit l'existence d'un noyau central polynucléotidique, riche en bases puriques, résistant à l'hydrolyse. Les polymères non diffusibles peuvent être séparés en deux catégories :

— Les uns insolubles dans l'acide acétique à 85 p. 100.

— Les autres insolubles dans un mélange à égal volume d'acide acétique à 80 p. 100 et d'alcool à 96°.

Au cours de ses travaux sur l'hydrolyse enzymatique, Bacher [73] retrouva cette libération très rapide de mononucléotides pyrimidiques.

Magasanick et Chargaff sont arrivés à des conclusions analogues [74]. Selon eux, l'attaque de l'acide ribonucléique par la ribonucléase fournit :

1° Des polynucléotides non dialysables.

3° Des oligonucléotides dialysables.

3° Des mononucléotides.

Les deux tiers des nucléotides de la fraction non dialysable sont formés d'acide guanylique. Les oligonucléotides dialysables comprennent la majeure partie de l'acide adénylique de l'acide ribonucléique, une partie moins importante d'acide guanylique

et une fraction infime d'acides cytidilique et uridylique. Parmi ces oligonucléotides dialysables, Markham a pu isoler deux substances intéressantes. Leur mobilité sur papier de chromatographie comparée à celle de dinucléotides synthétiques permet de les considérer comme telles. Il est donc évident que la ribonucléase ne donne qu'une dépolymérisation limitée de l'A.R.N.

La dégradation ultérieure de ces produits d'hydrolyse partielle par d'autres enzymes devait fournir des résultats particulièrement intéressants.

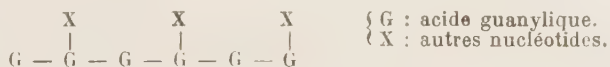
C'est ainsi que Schmidt soumit l'hydrolysât ribonucléasique à une phosphomonoestérase acide provenant de liquide phosphatique. Cet enzyme attaquait 93 p. 100 au moins des groupes phosphoryles attachés aux nucléosides pyrimidiques [75, 76]. La molécule nucléique serait donc constituée d'un noyau polynucléotidique contenant la majeure partie de nucléotides puriques et quelques résidus pyrimidiques sous forme de monoesters phosphates (polynucléotide limite); sur ce noyau purique se grefferaient des chaînons formés essentiellement de nucléotides pyrimidiques.

L'ensemble de ces résultats soulève évidemment la question de la spécificité de la ribonucléase. En effet cet enzyme rompt des liaisons entre nucléotides pyrimidiques, mais il est bien certain qu'il ne peut rompre toutes ces liaisons puisque des nucléotides à base pyrimidique sont retrouvés en fin d'hydrolyse dans les oligonucléotides dialysables et dans les polynucléotides limites. Pour rendre compte de la spécificité enzymatique Magasanick et Chargaff ont proposé deux hypothèses [74].

1° La plupart des nucléotides pyrimidiques seraient unis directement les uns aux autres. Une faible proportion s'intégrerait dans un noyau de nucléotides à bases puriques.

2° La ribonucléase hydrolyserait toutes les liaisons internucléotidiques sauf celles où prend part l'acide guanylique. Cette dernière hypothèse trouve une confirmation dans le fait que l'A.R.N. de pancréas, très riche en acide guanylique, est caractérisé par une résistance notable à la ribonucléase.

Magasanick et Chargaff suggèrent pour les polynucléotides limites, les structures suivantes :

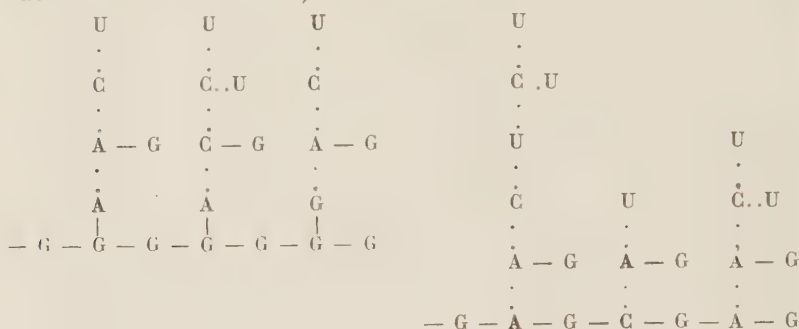


ou bien :



Par conséquent la structure de la molécule d'acide ribonucléique pourrait se traduire par les schémas suivants (dans ces

schémas les traits — indiquent les liaisons résistantes à la ribonucléase, les traits en pointillés indiquent des liaisons labiles à la ribonucléase).



Parallèlement à ces travaux sur la séquence des nucléotides dans la molécule nucléique, se développaient des études non moins intéressantes sur les modes de liaisons entre les différentes molécules.

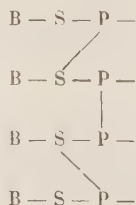
III. — Nature des liaisons internucléotidiques.

Les mesures titrimétriques ont apporté une aide très précieuse à la résolution de ce problème : elles permettent de déterminer les groupes fonctionnels libres d'un A.R.N., ainsi que les liaisons internucléotidiques attaquées au cours des hydrolyses alcalines ou enzymatiques.

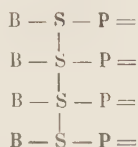
a) GROUPES LIBRES D'UN A.R.N. NON HYDROLYSÉ. — Nous rappellerons le travail fondamental de Levène et Simms. Ces auteurs ont étudié les pH de dissocation des groupes principaux des nucléotides et nucléosides [77, 78].

A partir de ces données, ils ont construit la courbe de titration théorique d'un tétranucléotide. Ses caractéristiques essentielles sont 4 acidités phosphoriques primaires de pK : 2 et une acidité phosphorique secondaire de pK 6. Leurs résultats expérimentaux sont en assez bon accord avec la théorie.

Feulgen [79] proposa une structure tétranucléotidique avec 4 acidités primaires, d'après le schéma :



Thomas et Dox [80] effectuèrent des titrations à la phénol-phthaléine comme indicateur. Ils trouvèrent 8 équivalents bases, par tétranucléotide, ce qui correspond à une structure éther-oxyde :

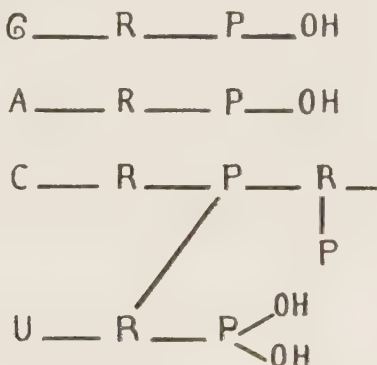


Mais Chantrenne a discuté ces résultats : en effet, en passant de pH 2,5 à pH 8,5 on libère de leur chlorhydrate un peu plus de 2,5 équivalents de fonction NH_2 ; on neutralise un équivalent base d'acide phosphorique secondaire et environ 1/4 d'équivalent de groupes phénoliques d'hétérocycles [81]. Or, pour déplacer le pH de 2,5 à 8,5, il faut ajouter 4 équivalents soude. On voit que ces 4 E. S. ne sont pas fixés par des groupes acides phosphoriques primaires.

Fletcher [82], titrant un acide ribonucléique à partir de son pH initial, trouve que 3,4 équivalents soude étaient fixés par 4 nucléotides ; de même dans l'acide désaminé, ce qui conduit à un schéma du type suivant, par exemple :

Dissociation acide primaire pour l'acide guanylique : G. . . .	1
Dissociation acide primaire pour l'acide adénylique : A. . . .	1
Dissociation acide primaire pour l'acide uridylique : U. . . .	0,7
Dissociation acide secondaire pour l'acide uridylique : U. . . .	0,7

avec la formule :



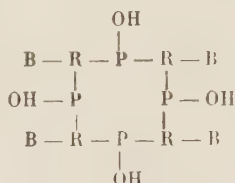
L'abaissement de la constante de dissociation pour l'acide uridylique dans le cas précédent, serait pour Allen et Eiler une conséquence de l'ionisation des deux autres groupes acides primaires [83].

b) GROUPES APPARUS APRÈS HYDROLYSE. — *Les groupes OH phosphoriques.* — L'hydrolyse alcaline ou bien enzymatique libère des groupements acides.

L'apparition de mononucléotides sous l'influence des *alcalis* est un fait connu depuis longtemps.

Levène a titré le nombre d'acidités apparues après une hydrolyse de vingt-quatre heures dans une solution de soude 0,1 N. à 27° : approximativement 4 groupes acides apparaissent par tétranucléotide.

Takahashi [40, 41, 42] par action couplée de *mono* et de *diestérases* a mis en évidence 4 acidités primaires : l'acide nucléique de levure serait, pour cet auteur, formé d'association de tétranucléotides cycliques possédant 4 groupes phosphoryls doublement estérifiés.



Depuis lors, de très nombreux travaux ont été effectués sur l'hydrolyse de l'A.R.N. par la *ribonucléase*.

La difficulté d'obtenir des solutions enzymatiques d'activité spécifique très précise d'une part, la variabilité des conditions d'hydrolyse d'autre part (pH, température, durée) peuvent expliquer les divergences observées dans les résultats.

Tous, cependant, possèdent un lien commun : l'apparition de groupes acides se manifestant sur la courbe de titration dans une zone de pH comprise entre 5 et 8. Cette région est caractérisée par la dissociation de la fonction acide phosphorique secondaire à l'exclusion de toute autre. Le pK de cette fonction se situe à pH 6 et le point de l'inflexion des courbes à pH 8 correspond à sa neutralisation complète.

La ribonucléase libère donc des fonctions acides phosphoriques secondaires. Par convention, les résultats sont donnés en équivalents soude (E. S.) par tétranucléotide.

Voici quelques résultats :

Allen et Eiler.	0,75 à 0,95 E.S. [83]
Grégoire	0,91 [46, 47]
Zittle.	0,82 [84]
Chantrenne.	0,80 [85]
Wiener	0,68 [86]
Vandendriessche	1,20 [51]

L'influence des conditions d'hydrolyse a très bien été mise en évidence par Allen et Eiler [83]. Ils font agir de la ribonucléase sur l'A.R.N., quatre heures à 60°. Une électrotitration effectuée sur une partie aliquote de l'hydrolysats montre que les groupes acides libérés correspondent à 0,75 E.S. Au reste de la solution,

ils ajoutent une nouvelle quantité d'enzyme. Trois heures après, de nouveaux groupes acides sont apparus, correspondant à 0,20 E.S.

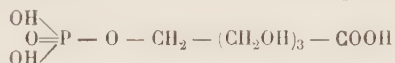
Quoi qu'il en soit, un fait reste certain : la ribonucléase libère des acidités phosphoriques secondaires. Dans quelles liaisons entrent ces groupes acides ?

Nous envisagerons successivement les différentes possibilités :

Liaison ester.
Liaison phosphamide.
Liaison phosphoénolique (énol d'une base).
Liaison pyrophosphate.

a) *Liaison ester.* — Classiquement, il était admis que cette liaison se faisait entre radicaux phosphoryls et fonction alcool du ribose soit en position C₂, soit en position C₃ [87].

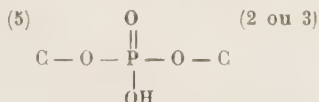
Il s'agit de fait d'une liaison beaucoup plus fragile qu'en 5, telle que celle que l'on trouve dans l'acide inosinique. A l'inverse de ce qui se passe pour les nucléotides de levure, l'acide inosinique est oxydé sans subir de déphosphorylation et se transforme en ester phosphorique de l'acide ribonique [88, 89].



Par contre, les nucléotides désaminés se comportent différemment à l'hydrolyse. Ainsi l'acide xanthylique (obtenu par désamination de l'acide guanylique) soumis à une hydrolyse aqueuse à pH 1,9 donne un ester ribose-phosphorique, isomère de l'ester de l'acide inosinique [89]. Par réduction, le ribitol obtenu est inactif sur la lumière polarisée. Or, on sait que le seul ribitol phosphorylé inactif est un ester phosphorique du ribose en 3 [90].

Ces arguments semblaient en faveur d'une liaison ester sur le carbone 3 du ribose [90].

Cependant Gulland [91, 92] a suggéré la possibilité d'une liaison en 5 du ribose. En effet le venin de certains serpents contient une 5 nucléotidase spécifique et ce venin libère 35 p. 100 des groupes phosphorylés des mononucléotides, ce qui conduirait au schéma suivant :



L'impossibilité d'isoler des nucléotides phosphorylés en C₅ l'a conduit à penser qu'au cours de l'hydrolyse pourrait se faire une migration de radical phosphoryle de 2 en 5 ; une 5 nucléotidase provoquerait la déphosphorylation, phénomène analogue à l'isomérisation de l'acide 3-phosphoglycérique en acide 2-phosphoglycérique dans la fermentation alcoolique.

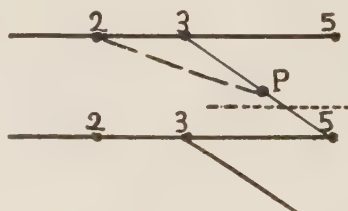
Déjà, Yamagawa en 1920, avait mis en évidence les différences entre la quantité de phosphore hydrolysé par de l'acide sulfurique $\frac{N}{10}$ à 100° pour chaque mononucléotide [93]. Les valeurs relatives suivantes rendent compte de ce fait :

Pour l'acide adénylique.	166
Pour l'acide guanylique	177
Pour l'acide uridylique.	48

Le radical phosphoryle de l'acide uridylique doit donc posséder une position différente de celle des autres nucléotides.

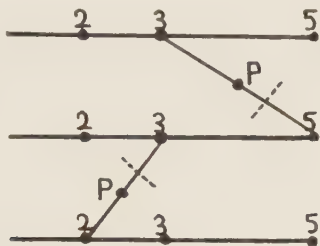
Des travaux très récents de Cohn permettent actuellement une interprétation beaucoup plus précise. Grâce à la chromatographie sur papier et par échangeurs d'ions W. E. Cohn et Carter ont pu mettre en évidence pour chacun des 4 nucléotides de l'acide ribonucléique 2 isomères désignés par les lettres *a* et *b*. Ces isomères correspondaient aux nucléotides dont le phosphate est respectivement lié au Carbone en position 2 ou 3 du ribose [94, 95, 96]. Cohn et Wolkin [97] firent agir le venin de *Crotalus adamanteus* sur de l'A.R.N. Ils analysèrent les produits de la digestion enzymatique par la technique des échangeurs d'ions : 77 p. 100 du phosphate se retrouvaient sous forme inorganique probablement par déphosphorylation des 5-nucléotides puisque le venin n'attaque pas les liaisons phosphate-ribose : P—C₃ et P—C₂.

Selon Brown et Todd [98] l'hydrolyse alcaline amènerait une rupture des liaisons P—C₅ et la formation ultérieure de liaisons P—C₃. Il apparaîtrait un « pont » ou « liaison interne » C₂—P—C₃ :

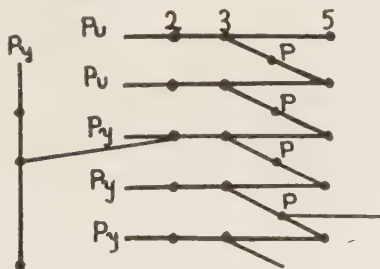


En fait, cet état serait très instable ; il se produirait une rupture très rapide des liaisons nouvellement créées et une libération en égale quantité des isomères nucléotidiques *a* et *b*. Toutefois, les auteurs ont trouvé dans les produits d'hydrolyse une plus grande quantité d'isomères *b* : ceci proviendrait du fait que la production de la forme *b* serait prédominante dans le cas des nucléotides pyrimidiques. Ces résultats sont confirmés par des études enzymatiques ; la ribonucléase agissant sur de l'A.R.N. libère en pre-

mier lieu des nucléotides pyrimidiques et son attaque est spécifique de la liaison internucléotidique phosphoryl-ribose : C_3-P-C_5 ou C_3-P-C_2 , la rupture se faisant toujours à distance du carbone en C_2 [99]. D'ailleurs, les travaux de Markham et de Smith renferment des arguments de valeur en faveur de ces théories.



S'appuyant sur ces constatations, Cohn a proposé le schéma de structure suivant [101] :



b) *Liaisons phosphamide*. — Brederick était parvenu à isoler, au cours de l'hydrolyse aqueuse un dinucléotide guanyluridique.

La difficulté de désamination de ce corps lui fit évoquer la possibilité d'une liaison phosphamide [54, 56, 102].

D'autre part, Gulland en 1938, en utilisant comme enzymes d'hydrolyse des mono- et des diestérases s'aperçut que 75 p. 100, mais pas plus, du phosphore total était libéré : un groupe phosphoryle était donc lié de manière différente des trois autres. S'appuyant sur les travaux de Brederick il suggéra l'existence d'une liaison phosphamide [91, 92].

Par la suite, Falconer [103] refit l'expérience de Brederick et mit également en évidence des dinucléotides guanyluridyliques. La désamination à 0° était impossible dans le cas du dinucléotide, très facile par contre pour l'acide guanydylique. Il semblait s'agir d'une liaison phosphamide alcali-sensible puisqu'elle était brisée après un séjour de vingt-quatre heures à pH 8,6.

Mais, en 1942, Brederick [44] par hydrolyse ammoniacale

ménagée réussissait à isoler des tétranucléotides. Or, soit par désamination à l'acide nitreux, soit par méthylation au sulfate de méthyle, le tétranucléotide obtenu se révélait identique à l'ancien du point de vue électrotitration. Cette constatation infirmait l'existence d'une liaison phosphamide. Mais nous avons vu les objections de Gulland au sujet de cette préparation de tétranucléotides.

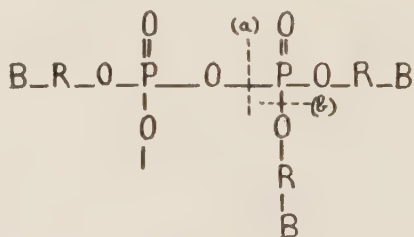
c) *Liaison phosphoenolique*. — Cette liaison signalée par Allen et Eiler [83] fut confirmée par Vandendriessche [51].

La courbe de titration sur une solution nucléique après hydrolyse enzymatique comparée à une courbe témoin permet les conclusions suivantes :

1° Dans la zone de pH 6 à 8 l'apparition d'acide phosphorique secondaire correspondant à 1,2 E.S. par tétranucléotide ;

2° Dans la zone de pH 9 à 12, une nouvelle dissociation apparaît se traduisant par une élévation de la quantité de soude consommée (environ 0,8 à 0,9 E.S. par tétranucléotide), le pH de cette fonction se situe aux environs de 9. Il s'agirait donc de groupes énoliques des bases azotées sous leur forme lactime.

d) *Liaison pyrophosphorique*. — En 1950, Wiener, Duggan et Allen ont suggéré l'existence de liaisons pyrophosphates entre nucléotides et, pour rendre compte de cette conception, ils ont proposé le schéma suivant [86] :



La libération de mononucléotides se ferait par rupture en (a) et en (b). Ainsi apparaîtraient des groupes acide phosphorique et des phosphates monoesters dans la proportion suivante :

$$\frac{\text{Phosphates monoesters}}{\text{Groupes acide phosphorique}} = \frac{66}{100}$$

Pour étayer leur théorie, les auteurs admettent que le rapport R entre les groupes phosphates monoesters (c'est-à-dire en principe les acidités phosphoriques secondaires) et le nombre des atomes de phosphore, est égal à environ 1/10 dans les grands polymères d'acide ribonucléique (ces polymères correspondraient à des

décanucléotides si l'on admet que chaque mononucléotide est lié au suivant par une des fonctions acides de son acide phosphorique).

Après action de la ribonucléase, puis dialyse de l'hydrolysât, on trouve que le rapport R est de :

1/2 dans le dialysât ;

1/3 dans le résidu non dialysable ;

et cependant dans ce résidu, existe encore une fraction nucléique assez élevée précipitable par l'acide acétique. Comment interpréter ces faits ?

Le rapport 1/3 dans l'ensemble du résidu de dialyse correspondrait, si les liaisons esters sont les seules possibles, à une moyenne de trinuécléotides. Or, le précipité acétique qui représente un certain pourcentage de l'ensemble doit être constitué par de longues chaînes plynuécléotidiques, donc avoir un rapport (R) très petit. Pour que la moyenne soit, comme on le constate, 1/3, il faudrait que la partie non précipitable par l'acide acétique ait un rapport très élevé voisin de 1, ce qui correspondrait à des mononucléotides, donc à des substances qui auraient dialysé.

Ces contradictions font soupçonner l'existence de liaisons internuécléotidiques autres que des liaisons esters.

L'existence de liaisons pyrophosphoriques serait en particulier compatible avec les résultats de Wiener. La rupture de telles liaisons entraîne l'apparition de 2 OH et explique, pour le rapport observé 1/3, l'existence, dans le résidu, de plynuécléotides formés en moyenne de 6 nucléotides.

La liaison pyrophosphorique est donc probable. Mais des expériences complémentaires doivent prouver son existence de façon plus explicite.

Telles sont les données actuelles que nous possédons sur les liaisons internuécléotidiques.

★ ★

Le but de cette revue très succincte était de mettre en évidence la complexité de structure des A.R.N., complexité qui s'allie vraisemblablement à leur spécificité biologique.

Le travail personnel que nous allons exposer est une contribution à l'étude de cette structure et de ses modifications sous l'action d'agents chimiques, telles que la ribonucléase, la force ionique ou le pH, associés suivant le cas à des facteurs physiques : chaleur et hautes pressions. Ces études sur les ultrapressions nous ont permis d'analyser, par ailleurs, l'influence des A.R.N. sur des réactions protéolytiques. Nous exposerons successivement les points suivants :

1° Fractionnement des acides ribonucléiques, par l'acide acétique. Application à l'étude de l'action enzymatique de la ribonucléase.

2° Influence des conditions d'action de la ribonucléase sur le remaniement possible des liaisons internucléotidiques de l'A.R.N.

3° Faits en faveur de liaisons de type secondaire dans l'A.R.N.

4° Comportement physico-chimique de l'A.R.N. sous l'action des hautes pressions hydrostatiques.

5° Influence des hautes pressions sur l'action enzymatique de la ribonucléase

Et sur l'hydrolyse enzymatique d'une protamine en présence ou en l'absence d'acide ribonucléique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. E. BRESLER et V. L. GLIKINA. *Biochimia*, 1947, **12**, 389.
- [2] S. E. BRESLER, V. L. GLIKINA, A. P. KONIKOV, N. A. SELEZNEVA et P. A. FINOGENOV. *Izvest Akd. Nauk, S.S.S.R. Ser. Fiz.*, 1949, **13**, 392.
- [3] M. MACHEBOËUF, J. BASSET, E. BARBU, M. LE SAGET et G. NUNEZ. *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18**, 471.
- [4] J. BRACHET. *Exp. annuels Biochimie med.*, 1951.
- [5] T. CASPERSON et B. THORELL. *Chromosoma*, 1941, **2**, 132.
- [6] T. CASPERSON et B. THORELL. *Naturwissenschaften*, 1941, **29**, 26.
- [7] L. DESCLIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 457.
- [8] M. HERLANT. *Arch. Biol.*, 1943, **54**, 225.
- [9] B. THORELL. *Cold Spring Harb. Symp.*, 1947, 247.
- [10] H. S. LORING. *J. Gen. phys.*, 1942, **25**, 497.
- [11] B. MALMGREEN et G. G. HEDEN. *Acta path. microb. Scand.*, 1947, **24**, 17 et 439.
- [12] G. SCHRAMM. *Ber.*, 1941, **74**, 537.
- [13] G. SCHRAMM et H. MULLER. *Zeit. Physiol. chem.*, 1940, **266**, 43.
- [14] G. L. MILLER et W. M. STANLEY. *Science*, 1941, **93**, 428.
- [15] G. SCHRAMM et H. MULLER. *Zeit. physiol. chem.*, 1942, **274**, 267.
- [16] J. BASSET, A. GRATIA, M. MACHEBOËUF et P. MANIL. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, **38**, 248.
- [17] M. LAUFFER et R. B. DOW. *J. Biol. Chem.*, 1941, **140**, 509.
- [18] F. GRIFFITHS. *J. Hyg.*, 1928, **27**, 113.
- [19] M. H. DAWSON et R. H. SIA. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New-York, 1930, **27**, 989.
- [20] M. H. DAWSON et R. H. SIA. *J. Exp. Med.*, 1931, **54**, 681, 701.
- [21] O. T. AVERY, G. M. MAC LEOD et MAC CARTY. *J. Exp. Med.*, 1944, **79**, 137.
- [22] G. R. BARKER, J. M. GULLAND et L. D. PARSONS. *Nature*, 1946, **157**, 482.
- [23] L. D. PARSONS, J. M. GULLAND et G. R. BARKER. *Symp. of the Soc. for Exp. Biol.*, 1947, 179.

- [24] F. GROS et M. MACHEBOEUF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 368.
- [25] F. GROS et M. MACHEBOEUF. *C. R. Ac. Sc.*, 1948, **226**, 1318.
- [26] F. GROS, M. BELJANSKI et M. MACHEBOEUF. *C. R. Ac. Sc.*, 1950, **231**, 187.
- [27] J. T. PARK et M. J. JOHNSON. *J. Bioch.*, 1949, **179**, 585.
- [28] H. FRIEDRICH-FRESKA. *Naturwiss.*, 1940, **28**, 376.
- [29] P. RONDONI. *Enzymologia*, 1941, **9**, 980.
- [30] H. CHANTRENNE. *Enzymologia*, 1944, **13**, 213.
- [31] A. Z. ORSTROM. *Zeit. Physiol. Chem.*, 0000, **241**, 1.
- [32] J. OSTERN, T. BARANOWSKI et J. Z. TERSZAKOWEC. *Zeit. Physiol. Chem.*, 1938, **251**, 258.
- [33] F. BINKLEY. *Exp. Cell Research*, 1952, suppl. 2, 45.
- [34] T. CASPERSSON. *Symp. of the Soc. Exp. Biol.*, 1947, 144.
- [35] T. CASPERSSON. *Nucleic Acid. Symp. of the Soc. for. Exp. Biol.*, 1951, 127.
- [36] I. WATANABE et K. ISO. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4836.
- [37] E. L. GRINNAN et W. A. MOSHER. *J. Biol. Chem.*, 1951, **191**, 719.
- [38] P. A. LEVÈNE. *Bioch. Ztschr.*, 1909, **17**, 120.
- [39] P. A. LEVÈNE. *J. Biol. Chem.*, 1918, **33**, 425 ; 1919, **40**, 415.
- [40] H. TAKAHASHI. *J. Bioch. Tokyo*, 1931, **14**, 25.
- [41] H. TAKAHASHI. *J. Bioch. Tokyo*, 1932, **15**, 19.
- [42] H. TAKAHASHI. *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 463.
- [43] W. KLEIN et A. ROSSI. *Zeit. Physiol. Chem.*, 1935, **231**, 104.
- [44] H. BREDERECK et J. HOEPFNER. *Ber.*, 1942, **75**, 1086.
- [45] W. ALLEN et J. J. EILER. *J. Biol. Chem.*, 1941, **137**, 757.
- [46] J. GRÉGOIRE. *Thèse de Sciences*, Paris.
- [47] J. GRÉGOIRE. *Les acides nucléiques*. CNRS, Paris, 1945.
- [48] E. CHARGAFF et E. VISHER. *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 715.
- [49] W. E. FLETCHER, J. M. GULLAND et D. O. JORDAN. *J. Chem. Soc.* 1944, 55.
- [50] L. DELCAMBE. *Bull. Soc. Chim. Belge*, 1950, **59**, 521.
- [51] L. VANDENDRIESCHE. *C. R. Carlsberg*, 1951, **27**, 342.
- [52] W. JONES et B. E. READ. *J. Biol. Chem.*, 1917, **29**, 111.
- [53] W. JONES et B. E. READ. *J. Biol. Chem.*, 1917, **31**, 39.
- [54] H. BREDERECK et F. RICHTER. *Ber.*, 1936, **69**, 1129.
- [55] R. FALCONER, J. M. GULLAND, G. I. HOLDAY et E. M. JACKSON. *J. Chem. Soc.*, 1939, 907.
- [56] H. BREDERECK, E. BERGER et F. RICHTER. *Ber.*, 1941, **74**, 338.
- [57] H. BREDERECK, A. MARTINI et F. RICHTER. *Ber.*, 1941, **74 B**, 694.
- [58] P. REICHART. *Nature*, 1948, **162**, 662.
- [59] M. KRUGGER. *Hoppe Seyl. Z.*, 1892, **16**, 160.
- [60] C. WULFF. *Hoppe Seyl. Z.*, 1893, **17**, 468.

- [61] J. DIRKX. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1952, **8**, 194.
- [62] J. SMITH et R. MARKHAM. *Biochem. J.*, 1950, **46**, 509.
- [63] G. PIGHINI. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1904, **38**, 247.
- [64] P. A. LEVÈNE et F. MEDIGRECEANU. *J. Biol. Chem.*, 1911, **9**, 375.
- [65] S. J. TANNHAUSER. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1914, **91**, 329.
- [66] P. A. LEVÈNE. *J. Biol. Chem.*, 1920, **48**, 379.
- [67] M. KUNITZ. *Science*, 1939, **90**, 112.
- [68] M. KUNITZ. *J. Gen. physiol.*, 1940, **24**, 15.
- [69] G. SCHMIDT et P. A. LEVÈNE. *J. Biol. Chem.*, 1938, **126**, 423.
- [70] D. A. Mc FEYDEN. *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 297.
- [71] H. LORING et F. H. CARPENTIER. *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 381.
- [72] F. G. FISHER, H. LEHMANN-ECHTERNACHT et I. BÖTTGER. *J. Prakt. Chem.*, 1944, 30.
- [73] H. LORING, F. H. CARPENTER et P. ROLL. *J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 600.
- [73 bis] J. BACHER et F. W. ALLEN. *J. Biol. Chem.*, 1950, **183**, 633.
- [74] B. MAGASANICK et E. CHARGAFF. *Bioch. et Biophys. Acta*, 1951, **7**, 397.
- [75] G. SCHMIDT, R. CUBILES et S. J. TANNHAUSER. *Fed. Proc.*, 1948, **7**, 184.
- [76] G. SCHMIDT, R. CUBILES, N. ZOILNER, L. HECHT, N. STRICKLER, K. SERAIDARIAN, M. SERAIDARIAN et S. J. TANNHAUSER. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 715.
- [77] P. A. LEVÈNE et H. S. SIMMS. *J. Biol. Chem.*, 1925, **65**, 519.
- [78] P. A. LEVÈNE et H. S. SIMMS. *J. Biol. Chem.*, 1926, **70**, 327.
- [79] R. FEULGEN. *Z. Physiol. Chem.*, 1919, **104**, 189.
- [80] A. THOMAS et W. DOX. *Z. Physiol. Chem.*, 1925, **142**, 1.
- [81] H. CHANTRENNE. *Bull. Soc. Chim. Belge*, 1946, **55**, 5.
- [82] W. E. FLETCHER, J. M. GULLAND et D. O. JORDAN. *J. Chem. Soc.*, 1944, 33.
- [83] F. W. ALLEN et J. J. EILER. *J. Biol. Chem.*, 1941, **137**, 757.
- [84] C. A. ZITTLE. *J. Biol. Chem.*, 1946, **166**, 491.
- [85] H. CHANTRENNE. *Bull. Soc. Chim. Belge*, 1946, **55**, 118.
- [86] S. WIENER, E. DUGGAN et F. W. ALLEN. *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 163.
- [87] P. A. LEVÈNE. *J. Biol. Chem.*, 1921, **48**, 119.
- [88] P. A. LEVÈNE et W. A. JACOBS. *Ber.*, 1909, **42**, 335 ; 1911, **44**, 746.
- [89] P. A. LEVÈNE et A. DMOCHOVSKY. *J. Biol. Chem.*, 1931, **93**, 563.
- [90] P. A. LEVÈNE et R. S. TIPSON. *J. Biol. Chem.*, 1932, **97**, 491.
- [91] J. M. GULLAND et E. M. JACKSON. *J. Chem. Soc.*, 1938, 1492.
- [92] J. M. GULLAND et E. M. JACKSON. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 597.
- [93] M. YAMAGAWA. *J. Biol. Chem.*, 1920, **43**, 339.
- [94] W. E. COHN. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1471, 2811.

- [95] W. E. COHN. *J. Cell Comp. physiol.*, 1951, **38**, suppl. I, 21.
- [96] C. E. CARTER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1466.
- [97] W. E. COHN et E. WOLKIN. *Nature*, 1951, **167**, 483.
- [98] D. M. BROWN et A. R. TODD. *J. Chem. Soc.*, 1952, 44 et 52.
- [99] E. WOLKIN et W. E. COHN. *Fed. Proc.*, 1952, **11**, 303.
- [100] R. MARKHAM et J. SMITH. *Nature*, 1951, **167**, 407.
- [101] W. E. COHN, D. G. DOUGHERTY et E. WOLKIN. *Phosphorus Metabolism*, 1952 (The Johns Hopkins Press).
- [102] H. BREDERECK, M. KOTHNIG et G. LEHMANN. *Ber.*, 1938, **71**, 2613.
- [103] R. FALCONER, J. M. GULLAND, G. I. HOLDAY et E. M. JACKSON. *J. Chem. Soc.*, 1939, 907.

STRUCTURE DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE

I. — FRACTIONNEMENT DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES PAR L'ACIDE ACÉTIQUE. APPLICATION A L'ÉTUDE DE L'ACTION ENZYMATIQUE DE LA RIBONUCLÉASE (*)

par P. VIGNAIS.

(*Institut Pasteur. Service de Chimie biologique*
[professeur MACHEBOEUF].)

L'étude cinétique de l'action de la ribonucléase nécessite un test précis d'évaluation des polynucléotides de différents poids moléculaires qui résultent de cette action. Nous avons à cet effet utilisé la précipitation fractionnée par l'acide acétique cristallisable.

La précipitation acide des acides nucléiques était connue depuis longtemps. Chantrenne [1] utilisa l'acide acétique pour précipiter les fractions hautement polymérisées (un volume de solution nucléique pour un volume d'acide acétique). Il proposa également [1] d'autres milieux précipitants, tels :

2 volumes	Acide acétique
1 volume	Acétone.
2 volumes	Eau.

ou encore :

1 volume	Acide acétique.
1 volume	Acétone.
7 volumes	Eau.

et recueillit le précipité obtenu par addition de 1 volume du mélange à 1 volume de solution nucléique.

Ghuysen [2], cependant, a montré que les hauts polymères isolés par Chantrenne manquent encore d'homogénéité : d'après leur courbe de solubilité, ils comporteraient deux fractions au moins. Ghuysen a proposé un nouveau mélange précipitant. méthanol + tampon acide acétique-acétate de sodium de force ionique 0,10.

Récemment, Vandendriessche [3], s'inspirant des méthodes de Chantrenne, s'est servi du mélange :

2 volumes	Acétone.
1 volume	Acide acétique
1 volume	Eau.

mis en présence d'un égal volume de solution d'acide nucléique.

Nous avons tenté de différencier par précipitation acétique les différents états de polymérisation de l'acide nucléique de levure. Une faible quantité d'acide acétique ajoutée à un certain volume de solution d'acide ribonucléique précipite la fraction hautement polymérisée de cet acide ribonucléique ; mais lorsque des quantités croissantes d'acide acétique sont ajoutées, on observe une précipitation progressive de polymères de poids moléculaires plus faibles. Les fractions ainsi précipitées possèdent des poids moléculaires d'autant plus faibles que la quantité d'acide acétique ajoutée est plus grande.

Nous avons utilisé de l'acide ribonucléique à l'état de sel de sodium provenant des Etablissements Prolabo. D'abord dissous dans une solution alcaline diluée, il fut purifié par la méthode de Sevag [4].

Cette méthode permet d'éliminer les protéines ; elle a pour principe la dénaturation des protéines par étalement aux interfaces. La solution à purifier est agitée avec du chloroforme. Les protéines se dénaturent progressivement et se rassemblent dans l'émulsion de chloroforme qu'on élimine par centrifugation. La solution nucléique, dont le pH est ajusté entre 5 et 6, est alors additionnée de 3 volumes d'alcool. Le précipité est repris, puis séché par l'alcool absolu. Le ribonucléate ainsi obtenu est facilement soluble dans l'eau. Notons qu'il n'est pas homogène quant au poids moléculaire : il s'agit d'un acide ribonucléique polydispersé.

Le premier échantillon de ribonucléate, que nous désignerons par N₁, est dissous dans de l'acide borique 0,2 M à la concentration de 7,5 mg/ml. Le pH final est 5,6. Le tableau suivant

TABLEAU I.

Acide acétique pour précipiter 1 volume d'A. N., en volumes.	1	2,5	5	10	15	20
Phosphore du précipité (1)	34	120	223	350	416	420
Proportion d'acide nucléique précipité p. 100	4,6	16,3	31	48	56,6	58

(1) Phosphore en microgrammes dans le précipité pour 1 ml de solution initiale.

indique les quantités de précipité obtenu avec des volumes croissants d'acide acétique ajouté à un même volume d'acide nucléique. Les précipités sont recueillis par centrifugation après une heure de contact à la température du laboratoire. Leurs quantités sont appréciées par leurs teneurs en phosphore (méthode de Machebœuf et Delsal [5]).

Nous constatons que la proportion de précipité par rapport

à la quantité totale d'acide nucléique tend vers une limite qui est pratiquement atteinte pour 20 volumes d'acide acétique. Ce phénomène est un fait général qui s'observe quel que soit le degré de polydispersion de l'acide ribonucléique utilisé.

Nous avons pensé qu'il s'agissait d'une précipitation fractionnée. Les données numériques que nous apportons sont les résultats d'expérimentation sur un autre échantillon d'acide nucléique (N_3) dissous dans un tampon phthalate de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml :

a) Les précipités obtenus par un volume d'acide acétique, par

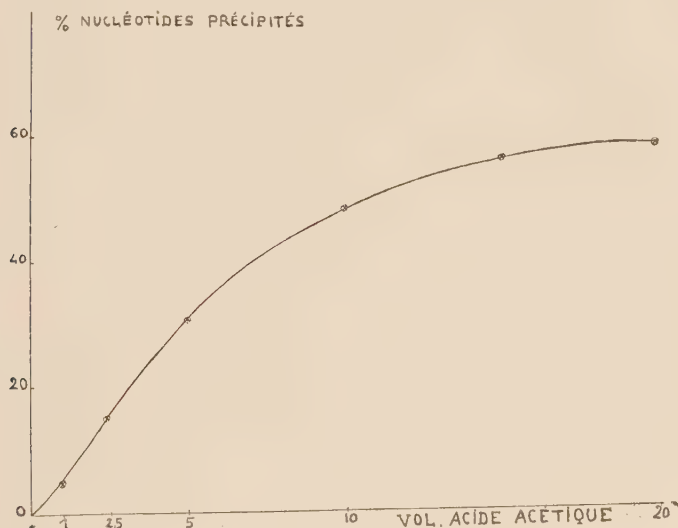


FIG. 4.

exemple, sont nettement plus riches en phosphore que l'acide ribonucléique initial qui contient à la fois nucléotides et nucléosides.

b) Des précipitations effectuées, l'une par 1 volume et l'autre par 20 volumes d'acide acétique fournissent des précipités dont les teneurs respectives en phosphore : P_1 et P_2 sont :

P_1	82 microgrammes.
P_2	464 microgrammes.

Si nous recueillons le liquide surnageant après précipitation par 1 volume d'acide acétique et si nous lui ajoutons 19 volumes d'acide acétique, nous obtenons un deuxième précipité dont la teneur en phosphore (393 microgrammes) est pratiquement égale à $P_2 - P_1$, ce qui constitue un bon contrôle.

c) Les fractions isolées par précipitation fractionnée, puis préparées à l'état de leur sel de sodium, présentent des solubilités dans l'eau différentes : les fractions les moins solubles correspondent à celles isolées par de faibles quantités d'acide acétique.

La précipitation fractionnée par l'acide acétique est donc susceptible de rendre compte des différents états de polymérisation d'un acide nucléique.

Par la suite, nous appellerons « hauts polymères » (H. P.) la fraction précipitable par 1 volume d'acide acétique, et « moyens polymères » (M. P.) la fraction précipitable entre 1 et 20 volumes d'acide acétique, laissant la désignation de « petits polymères » (P. P.) aux nucléotides solubles dans 20 volumes d'acide acétique. Notons que la solution-mère des « moyens polymères » peut contenir non seulement les « petits polymères », mais en outre des nucléosides. Il ne faut donc considérer comme « petits polymères » que la fraction soluble dans 20 volumes d'acide acétique et précipitable par l'acétate d'uranyle en solution acide [6, 7].

La méthode de précipitation fractionnée par l'acide acétique nous a permis d'aborder l'étude cinétique de l'action de la ribonucléase sur l'acide ribonucléique grâce aux variations, au cours du temps, des hauts et moyens polymères.

La ribonucléase fut préparée suivant la méthode de Kunitz [8, 9], à partir de pancréas de Bœuf. L'extrait obtenu par l'acide sulfurique N/4 est précipité par le sulfate d'ammonium entre 0,7 et 0,8 de saturation. Après dialyse contre de l'eau bidistillée, la ribonucléase est traitée par l'alcool à 90° et obtenue ainsi sous sa forme cristallisée. Les cristaux sont remis en solution aqueuse. La solution est finalement évaporée sous vide à très basse température (lyophilisation).

Nous avons vérifié l'homogénéité de cette ribonucléase grâce à l'étude de sa mobilité par électrorhéophorèse (figure 1 a). Par ultracentrifugation (figure 1 b), nous n'avons pas non plus décelé de protéines étrangères (1).

La ribonucléase est mise en présence d'acide nucléique de levure dans les conditions suivantes :

1,25.10⁻³ mg de ribonucléase pour 1 ml de solution d'A. R. N. L'A. R. N. (échantillon N₃) a été dissous dans le tampon phthalate 0,2 M de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml.

Nous avons suivi l'hydrolyse en fonction du temps par des dosages de phosphore dans les précipités obtenus pour des proportions diverses d'acide acétique. Les chiffres du tableau II

(1) Nous tenons à remercier notre ami P. Slizewicz, qui a réalisé cette ultracentrifugation.

représentent les quantités de phosphore en microgrammes dans les H. P. et M. P. provenant de 7,5 mg d'A. R. N.

Nous constatons qu'après trente minutes d'hydrolyse, les hauts



FIG. 1 a.



FIG. 1 b.

TABLEAU II.

TEMPS ÉCOULÉ depuis le début de l'hydrolyse en minutes	PHOSPHORE en microgr. (H. P.)	VARIATION p. 100 (H. P.)	PHOSPHORE en microgr. (M. P.)	VARIATION p. 100 (M. P.)
0.	82	0	378	0
30.	29	— 64,5	237	— 37,3
120.	20	— 75	143	— 62
240.	19	— 76,8	123	— 67,4

polymères ont disparu dans la proportion de 64,5 p. 100 et les moyens dans la proportion de 37,3 p. 100.

L'hydrolyse des grands polymères évolue donc plus rapidement que celle des moyens polymères.

Pour confirmer ces premiers résultats, nous avons étudié l'action

de la ribonucléase à des dilutions plus grandes (tableau III) : 10^{-6} mg/ml.

Dans cette expérience, la proportion de ribonucléase est très

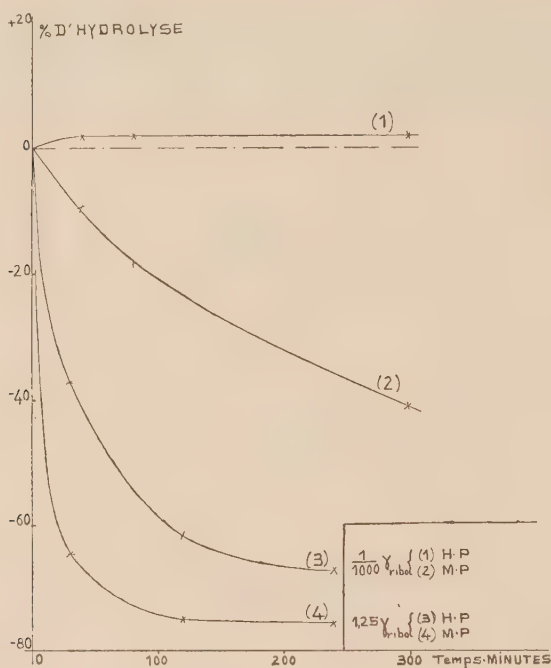


FIG. 2.

TABLEAU III.

TEMPS ÉCOULÉ depuis le début de l'hydrolyse en minutes	PHOSPHORE en microgr. (H.P.)	VARIATION p. 100 (H.P.)	PHOSPHORE en microgr. (M.P.)	VARIATION p. 100 (M.P.)
0.	82	0	378	0
20.	75	- 8,5	385	+ 2
80.	67	- 18,3	383	+ 2
300.	48	- 41,4	385	+ 2

faible et l'hydrolyse progresse très lentement. Nous pouvons ainsi mettre en évidence :

1° Une diminution de la proportion des hauts polymères ;

2° Une faible augmentation initiale des moyens polymères qui,

d'ailleurs, atteint très vite un maximum. (Si on prolonge l'expérience, les moyens polymères diminuent à leur tour.)

On peut penser que les hauts polymères fournissent dans un premier temps des moyens polymères. Ces derniers, à leur tour, subissent l'hydrolyse enzymatique. Pendant un certain temps, la teneur en moyens polymères reste constante, car la quantité qui se détruit est à peu près équivalente à la quantité qui prend naissance à partir des hauts polymères.

Après une hydrolyse très prolongée, il reste encore des hauts et moyens polymères. L'hydrolyse tend donc vers une limite. Ces faits mettent en évidence l'existence, dans les produits d'hydrolyse, de polynucléotides d'un degré de polymérisation assez élevé (insolubles dans l'acide acétique) résistants à la ribonucléase.

En résumé, il est possible, grâce à la précipitation fractionnée par l'acide acétique, d'apprécier une différence entre les vitesses d'action de la ribonucléase sur les fractions d'acide ribonucléique de divers poids moléculaires. Les fractions de plus haut poids moléculaire sont attaquées plus rapidement; mais il persiste toujours une certaine proportion de hauts polymères qui se montre résistante à l'action de la ribonucléase.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. CHANTRENNE. *Bull. Soc. chim. Belge*, 1946, **55**, 5.
- [2] J. M. GHUYSEN. *Bull. Soc. chim. Belge*, 1950, **59**, 490.
- [3] L. VANDENDRIESSCHE. *C. R. Lab. Carlsberg*, 1951, **27**, 342.
- [4] M. G. SEVAG. *J. Biol. Chem.* 1938, **124**, 425.
- [5] M. MACHEBOEUF et J. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 116.
- [6] McFEYDEN. *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 297.
- [7] Ch. ZITTLE. *J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, 119.
- [8] M. KUNITZ. *Science*, 1939, **112**, 113.
- [9] M. KUNITZ. *J. gen. Physiol.*, 1940, **24**, 15.

STRUCTURE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

II. — MODE D'ACTION DE LA RIBONUCLÉASE INFLUENCE DE SES CONDITIONS D'ACTION SUR LE REMANIEMENT POSSIBLE DES LIAISONS INTERNUCLÉOTIDIQUES DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

par P. VIGNAIS.

(*Institut Pasteur. Service de Chimie Biologique*
[professeur MACHEBOEUF].)

L'étude précédente [1] nous a montré que les divers polymères qui constituent une préparation brute d'acide ribonucléique se comportent différemment vis-à-vis de la ribonucléase. Une certaine fraction de polynucléotides de hauts poids moléculaires reste inattaquée.

Cependant, une proportion appréciable est dégradée. Il est vraisemblable que cette dégradation se fasse par rupture de liaisons primaires internucléotidiques. Il nous a paru intéressant de nous attacher à ce problème. Nous avons voulu plus particulièrement montrer l'importance des conditions d'action de la ribonucléase sur la nature des liaisons rompues ou remaniées.

Des électrotitrations ont été réalisées sur des hydrolysats enzymatiques de hauts polymères d'acide ribonucléique. Ces polymères ont été obtenus en traitant un volume de solution nucléique à 7,5 mg/ml par un volume d'acide acétique. Le précipité formé est dissous dans une solution très diluée de bicarbonate de sodium, le pH étant ainsi amené à 5,6 ; par addition d'alcool absolu on sépare l'A. R. N. sous forme de ribonucléate de sodium (échantillon N₃).

Les hydrolyses ont été conduites suivant des conditions diverses. Les mesures de pH furent effectuées à 18° C au moyen d'une électrode de verre. La variation en millivolts pour une unité de pH à 18° C est de 58 millivolts.

Le vase contenant la solution à titrer est recouvert d'une membrane de caoutchouc où sont ménagées des ouvertures pour le passage des électrodes, de la pointe de la burette de titration, des tubes d'arrivée et de sortie d'azote. Les titrations se font,

en effet, sous courant d'azote purifié, évitant ainsi toute action acidifiante de l'anhydride carbonique de l'air.

Nous avons utilisé des solutions alcalines ou acides N/10 ou N/12,5. Nous ne pensons pas que la faible quantité de liquide réactif ajoutée puisse faire intervenir une correction sur la valeur des équivalents soude. Les résultats sont exprimés en équivalents soude (E. S.) par tétranucléotide.

Le nombre d'équivalents soude est égal au rapport :

$$\frac{\text{Nombre de molécules de Soude}}{\text{Nombre de tétranucléotides d'A.R.N.}}$$

Soient :

X ml la quantité de soude au titre T utilisé.

p le poids en milligrammes d'A. R. N.

r le rapport entre la quantité de phosphore calculée et sa valeur théorique : 95,5 p. 100.

Le poids moléculaire d'un tétranucléotide étant pris égal à 1 285.

$$E. S. = \frac{X \cdot T \cdot 1/1 \ 000}{p \cdot 95,5/100 \cdot 1/1 \ 285 \cdot 1/1 \ 000}$$

EXPÉRIENCE I. — Nous avons déterminé les courbes d'électro-titration :

1° D'une solution nucléique témoin sans ribonucléase (20 mg de hauts polymères d'acide ribonucléique de levure dissous dans 5 ml d'eau bidistillée) ;

2° D'un hydrolysats nucléique obtenu de la façon suivante : action de 500 microgrammes de ribonucléase sur 14 mg de hauts polymères dissous dans 5 ml d'eau bidistillée, à 38°, pendant quarante-huit heures. Le pH initial était de 5,61.

Des contrôles nous ont prouvé que la faible masse de ribonucléase introduite ne trouble pas l'électrotitration.

Quarante-huit heures après le début de l'hydrolyse, le pH est tombé à 4,88. Nous effectuons alors une titration par de la soude N/10 en notant le pH à chaque addition d'alcali. Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux I et I bis.

Pour une raison d'ordre pratique, l'origine des ordonnées pour les équivalents soude a été choisie à pH 5,61. C'est à ce pH qu'a été commencée l'hydrolyse de l'acide nucléique.

D'autre part, nous avons voulu étudier l'action des alcalis dilués sur les liaisons internucléotidiques de l'acide ribonucléique préalablement traité par la ribonucléase. En conséquence, nous avons effectué sur l'hydrolysats enzymatique d'A. R. N. une titration retour après un séjour de dix minutes à pH 9,38.

En comparant les courbes d'électrotitration directe sur la solution témoin et sur l'hydrolysats, nous constatons :

1° Qu'entre pH 5 et 6,5 ces courbes sont parallèles ;

TABLEAU I. — A. R. N. Témoin.

NaOH N/10 en ml	ÉQUIVALENTS SOUDE	pH
0	— 0,67	4,32
0,02	— 0,54	4,55
0,04	— 0,41	4,75
0,07	— 0,20	5,15
0,10	0	5,61
0,13	0,20	6,08
0,16	0,41	6,75
0,18	0,54	7,44
0,20	0,67	8,0
0,22	0,80	8,50
0,24	0,92	8,90
0,26	1,05	9,23

TABLEAU I bis. — Hydrolysats d'A.N.R.

E. S	pH (titration directe)	pH (titration retour)
0	4,88	5,10
0,20	5,40	5,48
0,40	5,88	5,78
0,58	6,26	6,09
0,77	6,66	6,30
0,87	6,90	6,42
0,96	7,16	6,54
1,05	7,41	6,71
1,15	7,67	6,90
1,24	7,95	7,07
1,34	8,23	
1,44	8,42	7,76
1,63	8,81	8,44
1,82	9,06	8,88
2,20	9,38	9,30

2° Qu'au-dessus de pH 6,5, s'amorce une divergence qui s'accroît à mesure que le pH s'élève.

Cet écart entre les deux courbes correspond vers pH 7,5 à 0,57 E. S. et vers pH 9,2 à 0,95 E. S.

Par ailleurs, si nous comparons la courbe de titration directe — « 2 » — effectuée sur l'hydrolysat avec la courbe de titration en retour — « 3 » — obtenue après action alcaline sur cet hydrolysat, nous observons au-dessous de pH 9 une divergence qui va en s'accroissant jusqu'à pH 7. Au-dessous de pH 7, les deux courbes se rapprochent. Elles se croisent à pH 5,75 et divergent ensuite en sens inverse.

Si nous comparons maintenant la courbe de titration du témoin — « 1 » — avec la courbe « 3 », nous constatons :

1° Dès pH 5,10, une divergence qui s'accroît jusqu'à pH 7,5, mais reste constante entre pH 7,5 et pH 8,5 : elle correspond alors à 0,85 E. S. ;

2° A partir de pH 8,5, un nouvel écart entre les deux courbes qui, à pH 9,2, correspond à 1,10 E. S.

L'ensemble des résultats nous conduit aux conclusions suivantes :

I. — L'examen comparatif des courbes « 1 » et « 3 » montre deux séries de dissociations.

La première met en évidence l'apparition de groupes acides

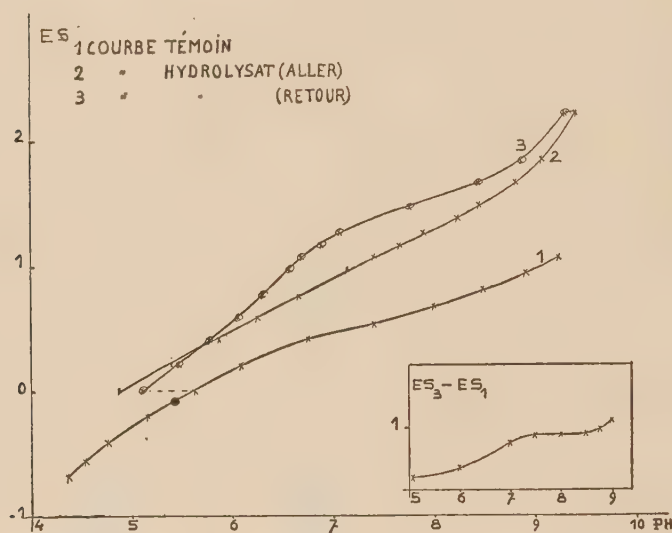


FIG. 1.

phosphoriques secondaires : en effet, leur pK se situe aux environs de 6 et leur neutralisation est terminée à pH 8.

La deuxième correspondrait à la libération de groupes énoïques des bases azotées. En effet, le pK de ces fonctions se trouve aux environs de 9,2.

II. — En fait, les divergences observées entre les courbes « 1 » et « 3 » sont le résultat de deux ordres de phénomènes :

a) Une action enzymatique à pH 5,6 ;

b) Une action alcaline à pH 9,38.

De quelle façon peut-on envisager le processus de cette hydrolyse ?

Sous l'influence de la ribonucléase à un pH relativement bas, se produiraient deux phénomènes différents :

1° Une rupture de liaisons esters : abaissement du pH par libération de fonctions acides phosphoriques ;

2° Un remaniement de certaines liaisons internucléotidiques. Une partie des liaisons esters (phosphate-ribose) se transposerait en liaisons phosphates d'amine.

Ceci expliquerait :

La faible dissociation dans la région des acides phosphoriques secondaires (courbe « 2 ») ;

L'apparition de dissociations nouvelles lors de la titration « retour » sur l'hydrolysate enzymatique. En effet, les liaisons phosphates d'amine, à un pH alcalin de l'ordre de 9,2, seraient rompues et libéreraient :

a) Des acides phosphoriques secondaires mis en évidence de pH 8 à pH 6 ;

b) Des groupes aminés des bases azotées qui rendent compte de l'élévation du pH final par rapport au pH initial.

Nous avons pensé que les conditions d'hydrolyse étaient d'une importance capitale et que leur variation entraînait des changements appréciables dans les caractères de l'hydrolysate et la nature des liaisons rompues. C'est pourquoi nous avons effectué une autre expérience suivant un protocole différent.

EXPÉRIENCE II. — La solution témoin contient 18 mg de hauts polymères d'A. R. N. dissous dans 10 ml d'eau bidistillée. Une autre solution contient les mêmes proportions d'A. R. N. et, en outre, 1 mg de ribonucléase ; le tout dissous dans 10 ml d'eau bidistillée.

La quantité de ribonucléase utilisée est donc plus élevée que dans l'expérience précédente. De plus, ici, l'hydrolyse se fait à 50°, pendant une durée de cinq heures. Le pH initial était de 5,78. Nous avons suivi la chute du pH au cours du processus d'hydrolyse.

TEMPS en minutes	pH
0	5,78
5	5,32
30	5,24
240	5,13
300	5,12

Après cinq heures, l'hydrolyse a donc atteint sa limite. Nous procédons alors à l'électrotitration de la solution hydrolysée par de la soude N/12,5 (tableaux II et II bis).

TABLEAU II. — A. R. N. Témoin.

NaOH N/12,5 en ml	E. S.	pH
0	1,32	3,90
0,02	1,20	4,0
0,04	1,08	4,10
0,06	0,96	4,21
0,08	0,84	4,35
0,10	0,72	4,52
0,12	0,60	4,69
0,14	0,48	4,90
0,16	0,36	5,09
0,18	0,24	5,29
0,20	0,12	5,50
0,22	0	5,78
0,24	0,12	6,16
0,26	0,24	6,59
0,28	0,36	7,09
0,30	0,48	7,59
0,32	0,60	8,16
0,34	0,72	8,66
0,36	0,84	9,07
0,38	0,96	9,30
0,40	1,08	9,52
0,42	1,20	9,69

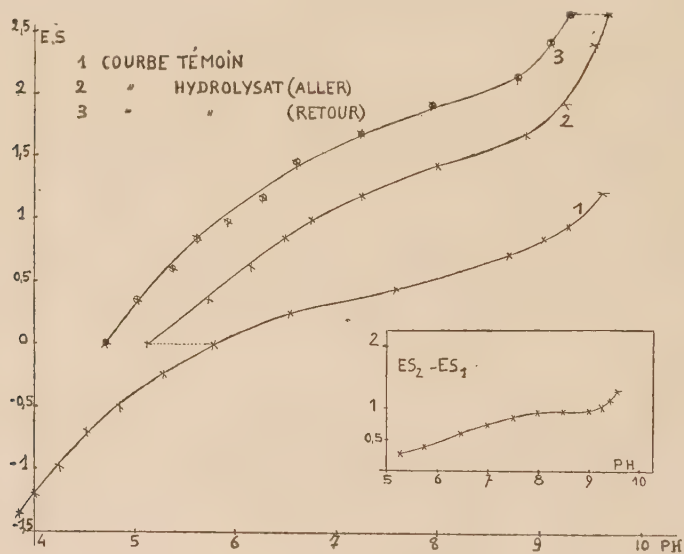


FIG. 2.

Ici également, l'origine des ordonnées, pour les équivalents soude, a été choisie à 5,78, pH auquel a commencé l'hydrolyse de l'acide ribonucléique.

TABLEAU II bis. — **Hydrolysat d'A.R.N.**

E. S.	pH (Titration directe)	pH (titration retour)
0	5,42	4,67
0,36	5,72	4,97
0,60	6,49	5,40
0,84	6,50	5,67
0,96	6,67	5,93
1,20	7,30	6,26
1,44	8,00	6,61
1,68	8,86	7,23
1,92	9,24	7,93
2,16	9,38	8,78
2,40	9,57	9,11
2,64	9,72	9,37

Si nous comparons la courbe de titration directe de l'hydrolysat « 2 » avec la courbe de titration de la solution témoin « 1 », nous constatons :

Une première divergence des courbes de pH 5 à pH 8, correspondant à 0,90 E. S., à pH 8 ;

Une deuxième divergence à partir de pH 9. A pH 9,67, l'écart entre les deux courbes correspond à 1,32 E. S.

A pH 9,72, nous avons laissé l'hydrolysat enzymatique séjourner trente minutes à 20° sous azote. Après ce laps de temps, le pH était tombé à 9,37. Nous avons alors titré en retour par de l'acide chlorhydrique N/12,5. La courbe obtenue, « 3 », présente dans tout son trajet un important décalage vers des pH inférieurs par rapport à la courbe de titration directe de l'hydrolysat « 2 ». Ce décalage, aux environs de pH 8, correspond à 0,5 E. S.

Nous pouvons interpréter ces faits de la façon suivante :

1° A l'examen des courbes « 1 » et « 2 », nous constatons, comme dans l'expérience précédente, l'existence de deux disso-
ciations :

De pH 6 à pH 8 se trouvent libérées des fonctions acides phosphoriques secondaires ;

A partir de pH 9, des fonctions éols font leur apparition.

2° Le déplacement de la courbe « 3 » par rapport à la courbe « 2 » peut se concevoir comme le résultat de l'apparition de groupes acides phosphoriques.

On peut penser que des groupes acides phosphoriques libérés entrent dans une liaison particulièrement sensible aux alcalis, assez analogue aux liaisons pyrophosphoriques alcali-labiles des ferments de Warburg et de von Euler.

Des liaisons pyrophosphoriques peuvent donc se concevoir en tant que liaisons internucléotidiques de l'acide ribonucléique.

En résumé, les liaisons dans lesquelles peuvent entrer les groupes acide phosphorique de l'acide ribonucléique sont de nombreux types. La liaison ester en position 2 ou 3 du ribose, liaison classique des schémas de Levene, semble la liaison principale. Mais Gulland a suggéré la possibilité de nucléotides intermédiaires possédant une liaison en 5 ; un équilibre se ferait entre les deux formes $P - C_2 \rightleftharpoons P - C_5$.

Parmi les autres liaisons susceptibles d'exister, nous avons envisagé les liaisons : phosphates d'amine, phosphates d'énol, pyrophosphates.

Ces liaisons possèdent un intérêt du point de vue énergétique. En effet, il est possible, d'après les travaux de Lippman, de considérer les liaisons ester $P - OH$ comme des liaisons de faible énergie ; les liaisons phosphates d'amine $P \sim NH_2$, phosphates d'énol $P \sim OH$, pyrophosphates $P \sim O \sim P$, comme des liaisons de haute énergie. Ainsi, l'acide ribonucléique représenterait dans la cellule un réservoir énergétique idéal pouvant, grâce à des libérations d'énergie, intervenir dans des réactions de synthèses diverses.

Par ailleurs, le mode d'arrangement des diverses liaisons internucléotidiques peut présenter une importance primordiale. Leur répétition suivant une période bien déterminée limite peut-être des motifs caractéristiques. Astbury a mis en évidence, grâce aux rayons X, une période de 16 nucléotides dans l'acide désoxyribonucléique. Il est possible qu'une alternance d'un type analogue existe dans certains acides ribonucléiques. Ces acides nucléiques serviraient de modèles à certaines protéines de structure périodique. Mais des travaux récents imposent des considérations nouvelles. Sanger [2] vient en effet de mettre en évidence, dans l'insuline, un enchaînement d'acides aminés sans régularité ni périodicité. On peut cependant noter dans la partie centrale de la chaîne de la fraction B une prédominance des acides monoaminés-monocarboxyliques aliphatiques. Ne pourrait-on pas établir une comparaison entre cette disposition et celle des nucléotides dans l'acide ribonucléique ? Nous savons, en effet, que la ribonucléase découvre au sein de la molécule nucléique un noyau de nucléotides riches en bases puriques, sur lequel viendraient se disposer des chaînons plus riches en bases pyrimidiques.

La multiplicité des types de liaisons, l'ordre d'enchaînement des nucléotides sont peut-être en rapport avec la spécificité si étroite des acides nucléiques. Gulland [3, 4] a très justement insisté sur la notion d'isomérisation ; souvent des considérations analytiques classent, comme identiques, des acides nucléiques ; mais de simples modifications dans la séquence de leurs nucléo-

tides permettraient d'expliquer des différences dans leur comportement biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64 et thèse Doctorat ès sciences, Paris, juin 1952.
 - [2] F. SANGER. Symposia on quantitative biology, Cold Spring Harb. Symp. 1949.
 - [3] J. M. GULLAND. *Chemistry and Industry*, 1940, **59**, 321.
 - [4] J. M. GULLAND. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1947, **12**, 95.
-

STRUCTURE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

III. — QUELQUES FAITS EN FAVEUR DE LIAISONS DE TYPE SECONDAIRE DANS L'A.R.N.

par P. VIGNAIS

(*Institut Pasteur, Service de Chimie biologique*
[professeur MACHEBOEUF].)

Des expériences récentes de Gulland [1] montrent que l'alcalinisation de solutions d'acide thymonucléique au-dessus de pH 10 produit des modifications de structure de cet acide, décelables à l'électrotitration.

En titrant en retour à partir de pH 11, la courbe enregistrée présente, par rapport à la courbe directe, un décalage vers les pH inférieurs, décalage qui s'accroît nettement vers pH 9 (zone de dissociation des fonctions énols des bases azotées entrant dans la constitution des mononucléotides). A pH 7,5, la courbe « retour » croise la courbe directe, puis se détache peu à peu de cette dernière, mais cette fois vers des pH supérieurs. D'après Gulland, ces résultats permettent d'envisager l'existence de « ponts hydrogène », sensibles aux alcalis, reliant des fonctions énoliques et aminées entre bases azotées de nucléotides voisins.

D'autres faits sont venus confirmer cette hypothèse. Gulland [1, 2] a, en effet, montré que des solutions de thymonucléate de sodium ne présentent pas de variations de viscosité ou de biréfringence d'écoulement entre pH 5 et pH 10. Par contre, au delà de ces limites, on note un abaissement sensible de leur valeur. De toutes façons, il ne peut pas s'agir de rupture de liaisons covalentes du type ester par exemple, car il n'y a pas libération d'acidité phosphorique.

Par l'examen de films de thymonucléate de sodium au microscope électronique, Scott [3] a mis en évidence une aggrégation dans la largeur de chaînes de polynucléotides. Il est possible d'interpréter également ce phénomène en admettant l'existence de liaisons de type secondaire : ponts « hydrogène », forces de Van der Waals. Ces faits, observés sur l'acide désoxyribonucléique, nous ont conduit à la recherche d'une structure analogue dans l'acide nucléique de levure.

Nous avons séparé à partir d'un certain échantillon d'acide ribo-

nucléique N_3 une fraction relativement polymérisée en recueillant le précipité formé par addition d'un seul volume d'acide acétique cristallisable à un volume de solution d'acide nucléique contenant 10 mg/ml. Au précipité mis en suspension dans l'eau distillée, on ajoute une solution de bicarbonate de sodium, de façon à obtenir une dissolution complète et à amener le pH aux environs de 5,6. Le ribonucléate de sodium est précipité puis séché par de l'alcool absolu.

Nous présentons dans cet exposé trois types d'expériences qui semblent mettre en évidence l'existence de liaisons particulièrement labiles dans l'A. R. N.

1° ACTION DES ALCALIS.

Cette action a été étudiée par électrotitration. 18 mg de ribonucléate de sodium sont dissous dans 10 ml d'eau bidistillée. Par de

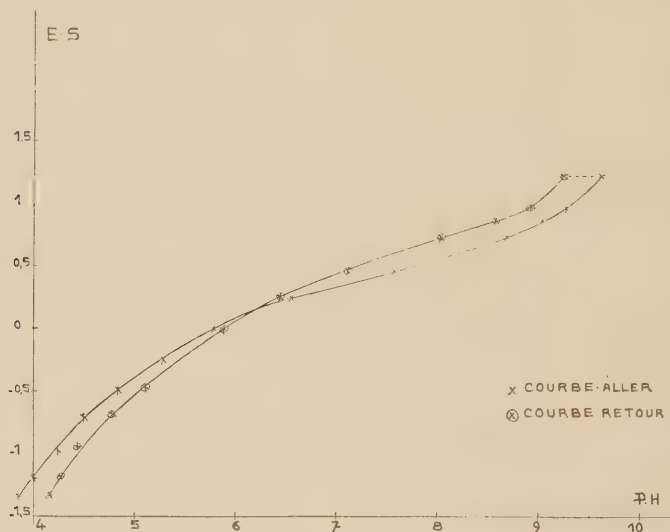


FIG. 1.

l'acide chlorhydrique, on amène le pH à 3,9 : ce sera le pH de départ. L'électrotitration se fait sous courant d'azote.

Nous ajoutons graduellement de la soude N/12,5 et nous notons la variation de pH après chaque addition. La mesure de pH est effectuée deux minutes après chaque addition de 0,04 équivalent soude (tableau I, fig. 1).

La courbe directe d'électrotitration présente un point d'inflexion

TABLEAU I.

NaOH N/12,5 en ml	ClH N/12,5 en ml	ÉQUIVALENTS soude (1)	TITRATION directe	TITRATION retour
0	0,42	1,32	3,90	4,15
0,02	0,40	1,20	4	4,26
0,04	0,38	1,08	4,10	4,37
0,06	0,36	0,96	4,21	4,48
0,08	0,34	0,84	4,35	4,62
0,10	0,32	0,72	4,52	4,78
0,12	0,30	0,60	4,69	4,95
0,14	0,28	0,48	4,90	5,11
0,16	0,26	0,36	5,09	5,25
0,18	0,24	0,24	5,29	
0,20	0,22	0,12	5,50	5,66
0,22	0,20	0,00	5,78	5,88
0,24	0,18	0,12	6,16	6,19
0,26	0,16	0,24	6,59	6,42
0,28	0,14	0,36	7,09	6,74
0,30	0,12	0,48	7,59	7,16
0,32	0,10	0,60	8,16	7,50
0,34	0,08	0,72	8,66	8,07
0,36	0,06	0,84	9,07	8,60
0,38	0,04	0,96	9,30	8,93
0,40	0,02	1,08	9,52	9,08
0,42	0	1,20	9,67	9,29
Equivalents	Nombre de moles de NaOH		X ml. N/12,5. 1/1000	
Soude	Nombre de moles d'A. R. N. assimilé à un tétranucléotide		18.95,.5/1001/12 85.1/1000	
X représente la quantité en ml de soude ajoutée. La proportion de phosphore des hauts polymères équivalent à 95,5 p. 100 de la valeur théorique. Le poids moléculaire d'un tétranucléotide est pris égal à 1 285.				
(1) Pour des raisons d'ordre pratique (Cf. travail antérieur sur l'hydrolyse enzymatique à pH 5,78), nous avons fixé arbitrairement à pH 5,78 l'origine des ordonnées où sont portées les valeurs d'équivalents soude.				

vers pH 8 puis se relève. Le pH final dans notre expérience est 9,67. La solution nucléique ainsi alcalinisée est laissée trente minutes à 18° sous courant d'azote. Mais toutes les dix minutes, une mesure de pH est effectuée et fournit les valeurs suivantes :

0 minute	9,67
10 minutes	9,48
20 minutes	9,33
30 minutes	9,29

Cet abaissement de pH en fonction du temps semble donc évoluer vers une limite.

Après trente minutes, nous faisons un titrage en retour par de l'acide chlorhydrique N/12,5. Le décalage de pH constaté tout d'abord diminue au fur et à mesure de l'acidification. La courbe

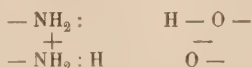
« retour » coupe la courbe directe aux environs de pH 6 et l'on voit alors s'amorcer un nouvel écart entre les deux courbes, mais cette fois en sens inverse. Après avoir ajouté un volume d'acide chlorhydrique égal au volume de soude utilisé lors de la titration directe, le pH de la solution nucléique est de 4,15, alors que le pH initial était de 3,90.

Dans la mesure où ce phénomène peut se comparer à celui observé par Gulland pour l'acide thymonucléique, nous pensons pouvoir conclure que :

1° Le titrage en retour met en évidence une dissociation de groupes énoïques et aminés des bases azotées ;

2° Le séjour de trente minutes à pH 9,67 suffit à rendre possible cette dissociation ;

3° Ce fait résulte d'une rupture de liaisons alcali-labiles. Une hypothèse vraisemblable serait, là aussi, l'existence de liaisons par pont hydrogène entre les fonctions énoïques et aminées des bases ; ces liaisons pourraient être stabilisées par résonance entre deux configurations possibles :



2° ACTION DES IONS.

C'est peut-être à de telles ruptures que se rapporte l'action dépolymérisante de certains tampons. Elle fut étudiée en comparant :

1° Les viscosités de solutions nucléiques polydispersées en eau distillée et en tampon ;

2° Les quantités de hauts polymères isolés par précipitation acétique dans les deux cas.

Les viscosités furent mesurées au viscosimètre d'Ostwald. La température fut maintenue constante à $22^\circ \pm 0,1$.

La période d'écoulement est notée en secondes.

Soit :

η_1	La viscosité de la solution nucléique.
η_0	La viscosité du liquide solvant.
t_1, t_0	Les temps d'écoulement respectifs.
d_1, d_0	Les densités spécifiques respectives.
k	La constante du viscosimètre.

$$\begin{aligned} t_1 &= k d_1 \eta_1 \\ t_0 &= k d_0 \eta_0 \end{aligned}$$

Pratiquement :

$$d_1 = d_0$$

Par conséquent, la viscosité relative :

$$\eta_r \text{ est égale à : } \frac{\eta_1}{\eta_0} = \frac{t_1}{t_0}$$

Le tableau II rapporte les temps d'écoulement en secondes :
 Pour l'eau bidistillée ;
 Pour l'acide nucléique en solution dans l'eau bidistillée ;
 Pour le tampon phtalate à pH 4,2 ;
 Pour l'acide nucléique en solution dans ce tampon.

TABLEAU II.

	TEMPS D'ÉCOULEMENT	
Eau bidistillée.	187 secondes 2/10. 187 secondes 4/10. 187 secondes 2/10.	Moyenne : 187,3
Tampon-phtalate pH 4,2.	190 secondes 2/10. 190 secondes 2/10. 190 secondes 6/10.	Moyenne : 190,3
Solution nucléique en eau bidistillée après 20 minutes.	196 secondes 8/10. 197 secondes. 196 secondes 8/10. 197 secondes.	Moyenne : 196,9
Solution nucléique en tampon après 20 minutes.	196 secondes 8/10. 196 secondes 6/10. 196 secondes 2/10. 196 secondes 4/10.	Moyenne : 196,5
Solution nucléique en eau bidistillée.	$\eta = \frac{196,9}{187,3} = 1,052.$	
Solution nucléique en tampon.	$\eta' = \frac{196,5}{190,3} = 1,032.$	
Nous constatons donc une baisse de la viscosité sous l'influence des sels de la solution tampon.		

Nous en déduisons les viscosités spécifiques des deux solutions d'acide nucléique. Ces solutions possèdent toutes deux une concentration en acide nucléique de 10 mg/ml.

Par *précipitation acétique*, nous avons, d'autre part, recherché la proportion d'acide ribonucléique précipitée. L'acide nucléique a été dissous dans les tampons phtalates dont les pH respectifs étaient :

4,2 5,6 6,2

et les forces ioniques :

0,052 0,065 0,073

A 1 ml de solution nucléique à 7,5 mg/ml nous ajoutons un égal volume d'acide acétique pur.

Le poids de phosphore obtenu dans les précipités a pour valeurs :

Lorsque la force ionique est de 0,052	100 microgrammes.
0,065	82 microgrammes.
0,073	70 microgrammes.

Deux hypothèses pouvaient être envisagées pour interpréter ces faits :

Première hypothèse : Le séjour de l'A. R. N. dans les solutions tampons avant l'addition d'acide a suffi pour provoquer une dépolymérisation différente suivant le pH du tampon.

Deuxième hypothèse : Le pH du tampon aurait une influence minime ou nulle, mais sa force ionique influencerait fortement sur la dépolymérisation des hauts polymères.

Cette dernière hypothèse semble prévaloir.

Nous avons répété l'expérience sur un A. R. N. dissous dans deux tampons phtalates dont le pH était de 4,2, mais dont les forces ioniques respectives étaient :

0,052
0,026

Le poids de phosphore obtenu dans le précipité a pour valeur :

Lorsque la force ionique est de 0,026	140 microgrammes.
0,052	100 microgrammes.

Ainsi la dépolymérisation augmente à mesure que la force ionique croît.

Nous pensons que les ions en solution sont susceptibles d'agir sur des liaisons secondaires de l'A. R. N.

3° ACTION DE LA RIBONUCLÉASE.

La ribonucléase semble attaquer, elle aussi, dans un premier temps, les liaisons non covalentes. Nous avons opéré à pH 7 pour éviter toute influence de l'alcalinité sur la dépolymérisation.

10 mg de hauts polymères d'A. R. N. sont dissous dans 8 ml d'eau bidistillée. On complète à 10 ml avec une solution de ribonucléase, la concentration finale en ribonucléase étant de $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg par milligramme d'A. R. N.

La marche de l'hydrolyse est suivie de deux façons :

1° Par mesure de la baisse de pH, au potentiomètre ;

2° Par précipitation acétique (1 volume de solution nucléique pour 5 volumes d'acide acétique). La mesure de la turbidité est faite à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier : les chiffres donnés correspondent aux divisions du tambour.

TABLEAU III.

TEMPS EN MINUTES	pH	TURBIDITÉ
0	7	35
2	6,92	20
7	6,78	17
22	6,59	15

Après une hydrolyse enzymatique totale, le pH final atteint 5,7. Donc, en vingt minutes, une fraction seulement des groupes

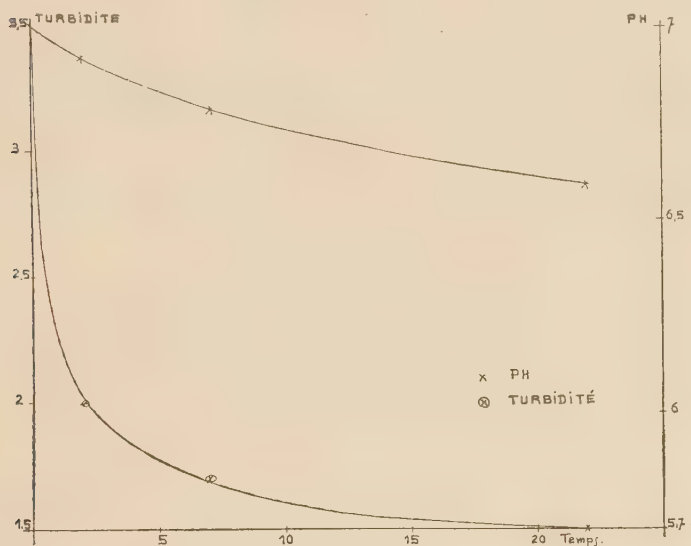


FIG. 2.

acides titrables est libérée. A ce moment, cependant, la chute de turbidité tend vers une limite.

La précipitation acétique dans l'étude d'une hydrolyse d'acide nucléique semble donc renseigner sur un stade précoce d'action enzymatique. On pourrait interpréter cette action initiale comme une rupture de liaisons fragiles du même ordre sans doute que les liaisons sensibles aux ions et aux alcalis.

Comment concilier une telle hypothèse avec la spécificité d'attaque enzymatique vis-à-vis du substrat? Il faudrait, par exemple, supposer que la fixation d'une molécule de ribonucléase sur une liaison ester entraîne, à l'autre extrémité du nucléotide,

une disparition de la résonance entre les structures stable et activée des fonctions aminées et énoliques des bases.

En résumé, l'acide nucléique de levure paraît caractérisé par des liaisons secondaires à type de « ponts hydrogène » unissant des chaînes polynucléotidiques. Une alternative périodique entre deux configurations possibles : stable et activée, s'expliquerait peut-être par un phénomène de résonance. Cette résonance stabiliserait les liaisons et maintiendrait l'union des chaînes.

Ces liaisons émol-amines jouent peut-être un rôle important dans l'élaboration des polynucléotides hautement polymérisés. La biologie moderne envisage les phénomènes d'autoreproduction non seulement dans les ultra-virus mais aussi dans les cellules des métazoaires, les appliquant essentiellement au doublement des chromosomes ou de leurs chromatides et à la multiplication des microsomes. La possibilité de résonance, inhérente au type de liaison émol-amine, ne permet-elle pas justement d'entrevoir, en regard des bases d'un polynucléotide, une attraction de nucléotides homologues ? Ceux-ci s'uniraient dans la suite par des liaisons covalentes.

Ainsi s'expliquerait à l'échelle moléculaire les phénomènes d'autoreproduction.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. M. GULLAND, D. O. JORDAN et H. F. TAYLOR. *J. Chem. Soc.*, 1947, 1129.
- [2] J. M. GULLAND. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1947, 12, 95.
- [3] J. F. SCOTT. *Bioch. Bioph. Acta*, 1948, 2, 1.

COMPORTEMENT PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LEVURE SOUQUIS A L'ACTION DES HAUTES PRESSIONS

(*Institut Pasteur.*)

Dans des mémoires précédents, nous avions tenté d'apporter quelques interprétations de la structure des acides ribonucléiques. Nous abordons, à présent, un sujet plus particulier : les modifications possibles de cette structure sous l'action d'agents physiques tels que les hautes pressions.

Depuis longtemps déjà, les recherches de Bridgmann et de Connant [1], de Connant et de Tongberg [2], ainsi que celles de Shapiro et de Raistrick [3, 4], avaient mis en évidence la polymérisation de divers composés organiques (isoprène, α -méthylstyrène, cyclopentadiène) soumis à des pressions de plusieurs milliers d'atmosphères.

Par ailleurs, les études faites sur des substances extraites de tissus animaux (protéines par exemple) et soumises aux hautes pressions apportaient des résultats particulièrement intéressants. Ainsi, dès 1914, Bridgmann [5] constatait un phénomène curieux : la prise en masse de blanc d'œuf qu'il avait soumis à une pression de 4 000 atmosphères pendant trente minutes.

En 1933, Basset, Machebœuf et Sandor [6] mettaient en évidence la gélification du sérum sanguin comprimé à 6 000 atmosphères pendant trente minutes. Des expériences récentes de Barbu, Machebœuf, Basset [7] ont souligné l'importance du pH dans ce phénomène de gélification.

Nous-mêmes avons observé certaines modifications physiques dans le cas d'une substance biologique assez complexe : l'antigène Vi. Cet antigène était extrait de bacilles d'Eberth [8]. Du point de vue chimique, on peut le considérer comme un complexe gluco-lipo-polypeptidique. Or, cet antigène, après avoir été soumis à une pression de 5 000 kg pendant trente minutes, présentait une augmentation très nette de viscosité. D'ailleurs, après retour à la pression atmosphérique, la viscosité diminuait rapidement et reprenait sa valeur initiale au bout de deux heures environ. Sans doute, la compression avait-elle provoqué la formation d'agrégats moléculaires instables [9].

On pouvait se demander si les acides nucléiques, qui sont, eux aussi, des macromolécules peu stables, présenteraient également des modifications physico-chimiques.

DESCRIPTION-TYPE D'UNE EXPÉRIENCE.

Une ampoule de verre surmontée d'un tube en caoutchouc « para » pur, non vulcanisé, est remplie du liquide à expérimenter.

Après remplissage (sans bulle d'air) on ferme l'ouverture en soudant le caoutchouc avec une pince à mors plats légèrement chauffée.

On s'assure avant la mise en pression de l'étanchéité de l'ensemble.

Le tube est alors plongé dans le liquide de la presse hydraulique et la pression est établie lentement en deux à trois minutes, de façon à éviter tout échauffement local.

La température à l'intérieur des presses est maintenue constante à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ par un dispositif thermostatique, sauf dans une expérience où elle fut de 38°C .

Les pressions s'échelonnèrent suivant les essais de 2 000 kg à 14 000 kg.

La décompression s'effectue *très rapidement*. En effet, lorsqu'il s'agit de solutions enzymatiques, la baisse de température produite par la décompression brusque a l'avantage de freiner l'évolution de la réaction enzymatique. Lorsqu'il s'agit de polymères artificiels formés sous pression, la chute brusque de pression stabilise leur état par un phénomène analogue à celui de la trempe.

Nous avons toujours opéré sur des solutions polydispersées d'acide nucléique de levure. La concentration était en général de 7,5 mg/m.

Nous avons utilisé au cours de notre expérimentation plusieurs échantillons d'acide nucléique que nous désignerons par N_1 , N_2 , N_3 . Ces échantillons diffèrent par leur degré de polymérisation.

Nous étudierons, ici :

La mise en évidence d'une polymérisation sous pression, puis les caractères de cette polymérisation.

L'état de polymérisation à la sortie de presse fut apprécié :

1° Par précipitation fractionnée au moyen de l'acide acétique (1) ;

2° Par mesure de la viscosité.

(1) Dans un travail ultérieur, en décrivant nos expériences sur le comportement des protéines sous pression en présence de trypsine, nous aurons l'occasion d'envisager un autre moyen d'apprécier indirectement l'état de polymérisation d'un échantillon d'A. R. N. Il s'agit de la précipitation par de la salmine partiellement hydrolysée.

I. — PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE ACÉTIQUE.

La précipitation acétique nous a permis d'étudier les phénomènes de polymérisation sous pression en fonction de différents facteurs :

- a) Conditions de la compression ;
- b) Polydispersion de l'échantillon nucléique utilisé ;
- c) pH et force ionique du tampon utilisé pour dissoudre l'A. R. N.

a) INFLUENCE DE LA PRESSION [10]. — Notre échantillon d'A. R. N (N_1) est amené à pH 5,6 avec de l'acide borique 0,2 M.

Des échantillons identiques ont été soumis pendant seize heures à 38° C à chacune des pressions indiquées dans le tableau I.

Les précipitations acétiques sont faites immédiatement après sortie de presse pour éviter tout risque de dépolymérisation spontanée.

Nous avons effectué des précipitations fractionnées par des volumes croissants d'acide acétique [11].

On juge de la quantité de précipité en dosant le phosphore qu'il contient.

TABEAU I. — Microgrammes de P dans le précipité pour 7 500 microgrammes d'A. R. N./cm³ (échantillon N_1 d'A.N.).

ACIDE ACÉTIQUE POUR PRÉCIPITER 1 vol. de solution d'A.R.N.	1 VOL.	2,5 VOL.	5 VOL.	20 VOL.
Témoin initial	34	120	223	420
Témoin après 16 heures	20	85	170	410
4 000 kg/cm ²	23	77	158	400
6 000 kg/cm ²	36	140	237	430
8 000 kg/cm ²	44	143	246	445
10 000 kg/cm ²	48	153	246	445
12 000 kg/cm ²	50	168	261	450
14 000 kg/cm ²	100	186	290	473

Pour la solution nucléique témoin, la précipitation par l'acétate d'uranyle qui met en évidence tous les nucléotides, y compris les mononucléotides, donne dans tous les cas (même après compression) 640 ± 10 µg de phosphore pour 7 500 microgrammes d'acide nucléique. Il reste donc dans cet A. R. N. une fraction appréciable de nucléosides (sans phosphore) qui ne précipitent ni par l'acide acétique ni par l'acétate d'uranyle.

Nous voyons, d'autre part, que les hauts polymères dans l'échantillon utilisé pour cette première expérience sont en faible quantité : 34 microgrammes. Les moyens polymères (fraction pré-

cipitant entre 1 et 20 volumes d'acide acétique correspondent à 386 microgrammes de phosphore, tandis que les petits polymères correspondent à 220 microgrammes de phosphore.

D'après les résultats indiqués aux différentes pressions, on peut constater : qu'au-dessus de 6 000 atm., il existe une augmentation de la quantité de précipité par l'acide acétique.

A 6 000 atm., cette variation est significative seulement pour le précipité obtenu par 2,5 vol. d'acide acétique.

A 8 000 atm., elle porte également sur la fraction précipitée par 1 seul volume d'acide acétique (hauts polymères).

A 14 000 kg/cm², l'augmentation de la quantité de phosphore du précipité est encore plus considérable. Elle porte uniquement sur la fraction des hauts polymères.

En effet, pour les fractions précipitées entre 1 vol. et 5 vol., par exemple, ou entre 1 vol. et 20 vol., il n'y a pas de polymérisation (différences entre première et quatrième colonne du tableau).

La variation de la quantité de phosphore constatée dans le précipité obtenu par 20 vol. d'acide acétique : 53 microgrammes, n'est que le reflet d'un phénomène localisé essentiellement sur la fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique, c'est-à-dire sur les hauts polymères.

Par contre, au-dessous de 6 000 atm., nous constatons une légère diminution de phosphore dans les précipités (2).

Nous avons vérifié par quelques essais que les quantités d'azote dans les précipités affectaient les mêmes variations que les quantités de phosphore :

Ainsi, à 6 000 kg/cm², nous avons obtenu les proportions d'azote indiquées dans le tableau II.

TABLEAU II. — Microgrammes d'azote dans le précipité pour 7 500 microgrammes d'A. R. N./cm³ (N₁).

ACIDE ACÉTIQUE pour précipiter 1 vol. d'A.R.N.	5 VOL.	20 VOL.
Témoin initial	352	672
6 000 kg/cm ²	378	684

Dans la mesure où la diminution de solubilité dans l'acide acétique est un bon critère de polymérisation, on peut conclure

(2) Cet échantillon d'A. R. N. contenait peut-être des traces d'enzymes malgré les purifications. Ceci pourrait expliquer les dépolymérisations observées au-dessous de 6 000 atm., c'est-à-dire pour des pressions qui ne peuvent pas inhiber l'action de la ribonucléase (voir plus loin).

ainsi (nous verrons que les mesures de viscosité confirment ces conclusions) :

1° Les variations des quantités de phosphore ou d'azote imposent l'idée d'une *polymérisation* au-dessus de 6 000 atm.

2° Il semble bien s'agir d'une polymérisation et non pas d'une synthèse enzymatique. En effet, nous verrons plus loin que le fait de comprimer des solutions nucléiques en présence de quantités croissantes de ribonucléase suffit à faire disparaître tout phénomène de polymérisation. Nous analyserons plus en détail cette action ultérieurement.

3° La polymérisation est d'autant plus importante que la pression est plus forte.

4° Plus la pression est élevée, plus le phénomène se localise dans des fractions de hauts polymères.

5° A 14 000 kg/cm², l'acquisition d'une proportion plus élevée de hauts polymères semble avoir son origine dans la fraction des petits polymères.

Il est donc logique de penser que le degré de polymérisation acquis sous pression est fonction d'un phénomène d'interdépendance entre les différentes catégories de polymères. C'est ce problème que nous allons étudier.

b) INFLUENCE DE LA POLYDISPERSION DE L'ÉCHANTILLON D'A. R. N. ÉTUDIÉ. — Nous avons expérimenté sur deux autres échantillons d'acide nucléique de levure (échantillons N₂ et N₃).

La poudre fut dissoute à la concentration de 7,5 mg/ml dans un tampon phthalate de pH 5,6. L'état de polydispersion des échantillons avant compression fut apprécié, comme dans l'expérience précédente, par une série de précipitations au moyen de proportions diverses d'acide acétique.

Les échantillons N₂ et N₃ différaient par les proportions relatives des hauts et petits polymères.

L'influence de la pression sur la polymérisation fut étudiée en examinant simplement la fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique [hauts polymères] (tableau III).

On note qu'il existe un certain parallélisme entre l'abondance des hauts polymères précipités par 1 vol. d'acide acétique après compression et la richesse en petits polymères de la solution polydispersée mise en œuvre.

Ainsi, pour l'échantillon N₂, le phosphore des hauts polymères avant et après pression est respectivement de 16 et de 20 microgrammes, celui des petits polymères 52 microgrammes. Pour l'échantillon N₃, le phosphore des grands polymères précipités avant la compression était de 82 microgr. ; après pression, il est de 116 microgr. ; celui des petits polymères est de 128 microgr.

TABLEAU III. — Microgrammes de phosphore dans le précipité acétique pour 7,5 mg d'A. R. N en tampon phtalate de pH 5,6.

	ÉCHANTILLONS avant compression				APRÈS COMPRESSION à 14 000 kg/cm ²	
	Précipitation				Précipitation	
	par l'acide acétique				par l'acétate d'uranyle	par l'acide acétique
	1 vol.	2,5 vol.	5 vol.	20 vol.	1 vol.	1 vol.
Échantillon n° 2 . . .	46	24	69	180	232	20
Échantillon n° 3 . . .	82	116	281	466	584	116

On peut donc se demander si la polymérisation plus notable dans l'échantillon N₃ n'est pas en rapport avec une teneur relativement élevée en petits polymères.

c) QUELQUES ESSAIS PRÉLIMINAIRES SUR LES INFLUENCES DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ACTION DE LA PRESSION. — Au cours d'essais préliminaires, nous avons été frappés de l'action dépolymérisante de certains tampons [12]. Nous avons rapporté cette propriété à la force ionique du tampon plutôt qu'au pH lui-même.

Il était intéressant d'étudier dans quelle mesure la variation de force ionique affectait les phénomènes de polymérisation sous hautes pressions.

Nos essais ont porté sur l'échantillon d'A. R. N. : N₃, dissous en tampons phtalates de différents pH : 4,2, 5,6, 6,2 et de forces ioniques respectives : 0,052 μ , 0,006 μ , 0,073 μ .

La concentration en A. R. N. était de 7,5 mg/ml, la pression de 14 000 kg/cm², pendant seize heures à 37°.

TABLEAU IV. — Microgrammes de P dans le précipité pour 7 500 microgrammes/cm³ d'A. R. N. (N₃).

Force ionique	0,052	0,065	0,073
pH final	4,2	5,6	6,2
1 kg/cm ² (1) . . .	100	82	70
14 000 kg/cm ² (1) . . .	151	116	88

(1) Fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique.

Dans cette expérience préliminaire deux facteurs varient simultanément : le pH et la force ionique. Ce fait est dû à la technique de préparation des tampons phtalates classiques que nous avons

utilisés. On ne peut donc pas attribuer, en toute certitude, l'action observée, à l'un ou à l'autre de ces facteurs. Cependant dans les limites de pH assez restreintes de cette expérience, le facteur prépondérant est probablement la force ionique. Nous avons vu [42], en effet, l'influence considérable de faibles variations de force ionique sur la dépolymérisation spontanée de l'A. R. N. à la pression atmosphérique.

Le but de cette expérience préliminaire était simplement de choisir un tampon convenable pour que la polymérisation par pression puisse se réaliser avec un bon rendement. Un tampon phthalique, par exemple, de pH 5,6 et de force ionique 0,065 est compatible avec une notable polymérisation sous pression. De plus, ce tampon permet aussi une action relativement efficace de la ribonucléase, fait intéressant pour l'étude des cinétiques enzymatiques sous hautes pressions ; c'est donc lui que nous avons choisi pour la suite de nos essais.

Dans tout ce qui précède, pour étudier la polymérisation par pression, nous nous sommes contentés du critère de précipitation fractionnée par l'acide acétique.

Envisageons, maintenant, les résultats obtenus en mettant en jeu un deuxième test : la viscosité.

II. — ETUDE DE LA VISCOSITÉ.

La viscosité de solutions nucléiques pressées ou non pressées fut étudiée avec le viscosimètre d'Oswald à 22°.

Il s'agissait de l'échantillon d'A. R. N. (N_3) polydispersé, dissous dans de l'eau distillée à la concentration de 10 mg/ml.

Le graphique 1 représente les variations de viscosité relative de la solution d'A. R. N. qui vient d'être soumise à l'action de la pression. Assez élevée peu de temps après la sortie de presse, la viscosité s'abaisse par la suite jusqu'à une certaine valeur qui reste stable.

Nous avons dissous notre acide nucléique dans de l'eau distillée afin d'éviter toute action dépolymérisante des ions d'un tampon.

L'allure de la courbe (1) indique qu'il s'agit essentiellement d'une polymérisation instable. Cependant, la valeur limite atteinte par la viscosité relative de la solution nucléique pressée reste plus élevée que celle de la solution témoin non comprimée.

Ces faits confirment parfaitement la conclusion à laquelle nous étions arrivés en utilisant le critère de précipitation acétique, à savoir : la formation par compression de hauts polymères instables. En effet, l'accroissement de viscosité noté à la sortie de la presse doit être interprété par la formation de macromolécules ou d'agrégats moléculaires.

D'autre part, la baisse rapide et spontanée de la viscosité après

sortie de presse peut être considérée comme liée à l'instabilité des polymères formés sous pression.

Cependant, l'analyse des courbes de viscosité laisse prévoir, pour une fraction certes très faible de ces polymères, des liaisons moins fragiles.

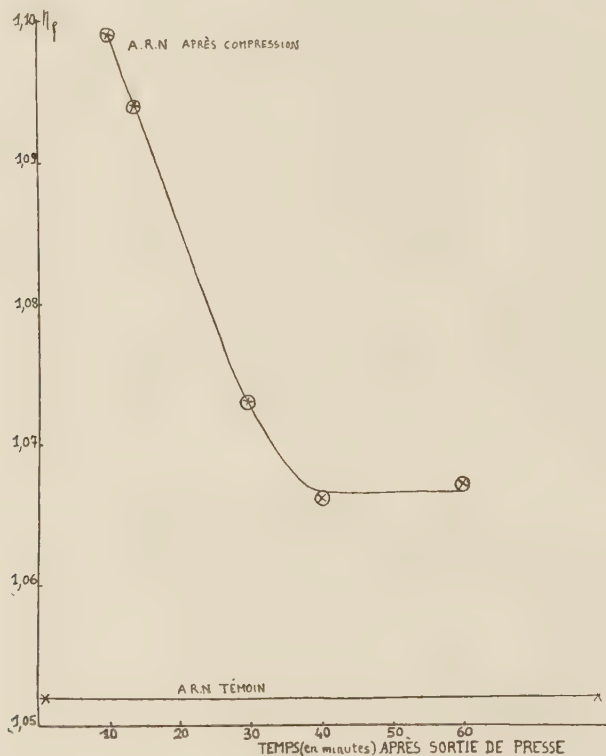


FIG. 4.

Par action de la ribonucléase et par électrotitration, nous avons essayé de déterminer la nature de ces liaisons stables.

1° ACTION DE LA RIBONUCLÉASE. — Nous présentons une de nos expériences mettant en œuvre des pressions respectives de 14 000 et de 6 000 kg/cm².

L'échantillon d'acide nucléique N₃ est dissous dans le tampon phtalate de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml. La ribonucléase purifiée par cristallisation [13] y est introduite à la concentration de 1,25 microgr./ml.

Nous rapportons ici l'étude de la dépolymérisation des hauts polymères (précipitables par 1 vol. d'acide acétique). La solu-

tion contenant l'A. R. N. en présence d'enzyme est laissée trente minutes à 37°. On divise cette solution en deux fractions :

1° La première partie est subdivisée en deux sous-fractions soumises respectivement à 14 000 et à 6 000 kg/cm² ;

2° La deuxième partie sert de témoin à 37° sous la pression atmosphérique.

La figure ci-contre (fig. 2) rend compte de l'action de la ribo-

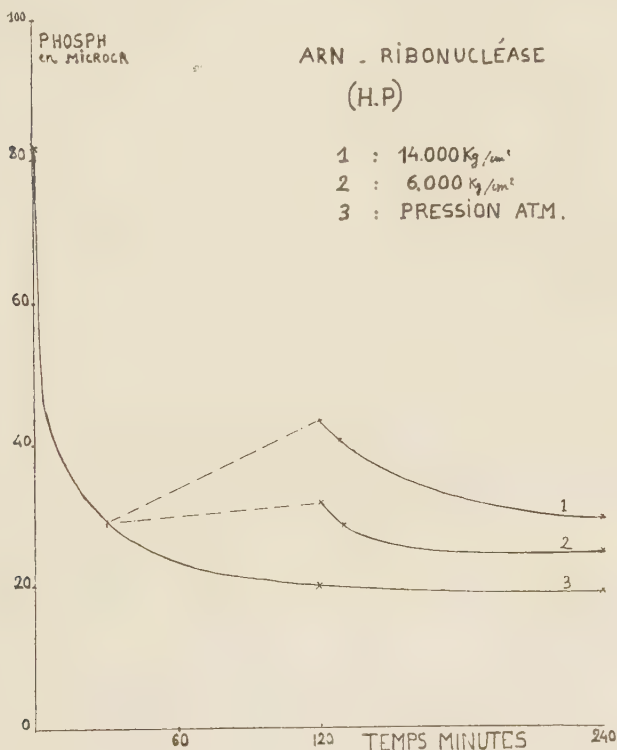


FIG. 2.

nucléase sur ces diverses fractions et permet les conclusions suivantes :

1° Après quatre - vingt - dix minutes de compression à 14 000 kg/cm², l'augmentation des grands polymères (G. P.) est très notable : la teneur en phosphore passe en effet de 29 microgr. à 43,5 microgr. Etant donné que la polymérisation se produit également en l'absence de ribonucléase nous pouvons penser à une inhibition de l'enzyme. Cette inhibition existerait uniquement pendant la durée de la pression.

En effet, sitôt la décompression achevée, l'hydrolyse reprend sa marche. Mais elle tend vers une limite qui est supérieure à la limite correspondant au témoin non comprimé.

2° A 6 000 kg/cm², nous avons observé un processus analogue, mais évidemment moins prononcé.

En somme, l'hydrolyse des hauts polymères d'une solution nucléique, après compression, évolue moins loin que pour un échantillon témoin laissé à la pression atmosphérique.

On pouvait se demander :

— si la ribonucléase stabilisait des liaisons instables formées sous hautes pressions ;

— ou bien si la ribonucléase était partiellement inactivée ou altérée.

En fait, la ribonucléase ne semble pas intervenir dans la création de liaisons stables.

Nous avons étudié la précipitation par l'acide acétique de la solution nucléique pressée en l'absence de ribonucléase. Nous avons donc comprimé cette solution d'A. R. N. à 14 000 kg/cm² pendant quatre-vingt-dix minutes. Sitôt le tube sorti de presse, et en outre deux heures après la décompression, on effectue la précipitation des hauts polymères dans la solution pressée et dans la solution témoin (par addition de 1 vol. d'acide acétique).

TABLEAU V. — Microgrammes de phosphore dans les précipités pour 1 ml d'A. R. N.

	TEMPS en minutes	TÉMOIN	SOLUTION comprimée
Compression	0	82,5	
Décompression	90		110
	210	81,5	95

Nous notons que, deux heures après la décompression, le taux de polymérisation est encore notable. Or, cette solution ne contenait pas d'enzyme. La ribonucléase n'intervient donc pas dans la formation de ces polymères stables.

Le deuxième problème à résoudre était celui d'une éventuelle inactivation de la ribonucléase, sous pression.

Nous avons pu vérifier expérimentalement que de la ribonucléase comprimée à 12 000 kg/cm² en l'absence du substrat conservait une bonne activité enzymatique.

Nous avons renouvelé ces expériences à 6 000 kg, cette fois en présence de substrat (7,5 mg/ml d'A. R. N. et 50 microgr./ml de ribonucléase).

Après quatre-vingt-dix minutes de compression, le tube est

retiré de la presse. On prélève dans le liquide qui vient d'être comprimé 0,05 ml (correspondant à 2,5 microgr. de ribonucléase) que l'on ajoute à 5 ml d'une solution à 7,5 mg d'A. R. N./ml. La concentration de l'enzyme est alors de 0,5 microgr./ml.

Après deux heures, nous avons recherché dans cette dernière solution, par précipitation acétique, la quantité de hauts polymères ayant résisté à l'action de l'enzyme. En d'autres termes, nous avons déterminé la limite d'hydrolyse des hauts polymères. La quantité de phosphore correspondant à 1 ml de solution nucléique était de 21,3 microgr.

Ainsi, malgré un contact de quatre-vingt-dix minutes, sous 6 000 kg/cm², avec un substrat, la ribonucléase retrouve après décompression une bonne activité. Des pressions de 6 000 kg/cm² n'altèrent donc pas la structure de cet enzyme.

L'existence, dans le cas de solutions nucléiques pressées, d'une limite d'hydrolyse enzymatique supérieure à celle d'un témoin peut s'interpréter comme le fait de liaisons acquises sous pression, relativement stables et résistantes à la ribonucléase.

Dès lors, il devenait intéressant de rechercher s'il ne s'agissait pas de liaisons d'électrovalence, facilement décelables à l'électrotitration.

2° RÉSULTATS FOURNIS PAR L'ÉLECTROTITRATION. — Des expériences préliminaires ont été effectuées sur l'échantillon N₃ d'A. R. N. dissous dans de l'eau distillée. Nous avons tracé les courbes d'électrotitration pour cette solution nucléique polydispersée avant et après compression (fig. 3).

La concentration en A. R. N. des solutions était 7,5 mg/ml. La pression mise en œuvre fut de 12 500 kg/cm² pendant seize heures à 37° C (3). L'échantillon fut soumis à l'électrotitration environ une heure après sortie de presse. Ce sont donc des modifications stables que nous étudierons ici.

Les méthodes d'électrotitration sont analogues à celles des expériences de nos travaux antérieurs [14].

Les mesures sont faites sur 5 ml de solution nucléique contenant 37,5 mg.

L'examen des courbes d'électrotitration fournit les renseignements suivants :

1° La valeur du pH de la solution nucléique comprimée (pH : 5,80) est légèrement supérieure à celle de la solution témoin.

2° Les courbes d'électrotitration présentent un décalage assez net dans une zone comprise entre pH 5 et pH 8,5 : la quantité

(3) Il est possible d'élever la pression jusqu'à 14 000 kg/cm² pour des tampons de force ionique au moins égale à 0,05 μ ; mais à pareille pression, l'eau distillée serait solide.

d'Equivalents Soude nécessaires pour neutraliser les fonctions titrables de l'échantillon nucléique pressé est moins élevée que celle utilisée pour l'échantillon témoin. Il s'agit donc soit d'une diminution de groupes acides titrables, soit d'une apparition de groupes aminés.

On pouvait penser que la légère variation de pH était due à une alcalinisation de l'eau par un verre riche en potasse. Nous avons donc réalisé une expérience avec de l'eau bidistillée dans la même ampoule sans acide nucléique. La variation de pH

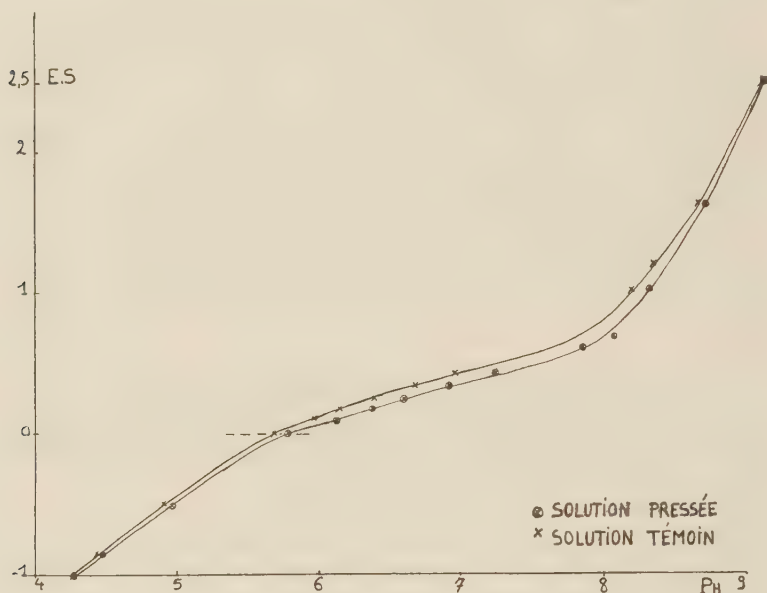


FIG. 3.

constatée, de l'ordre de 0,20, ne peut entrer en ligne de compte car elle correspond à une quantité d'Equivalents Soude insignifiante.

D'ailleurs, nous avons repris ces expériences en plaçant la solution dans un simple tube de caoutchouc soudé à ses deux extrémités et nous avons obtenu des résultats identiques.

Il s'agit donc d'une variation de pH inhérente à une modification de liaisons électrovalentes.

Cette variation ne semble pas due à une augmentation des groupements aminés (la dissociation n'augmente pas au-delà de pH 5), ni à une diminution des groupes énoïques des bases azotées (leur pK de dissociation, en effet, se situe aux environs de 9,2).

La mise en œuvre d'une quantité plus faible d'Equivalents Soude pour titrer la solution nucléique pressée pourrait s'interpréter comme la conséquence d'une diminution de groupes acides phosphoriques secondaires. Nous savons, en effet, que ces groupes sont mis en évidence, par électrotitration, dans une zone de pH comprise entre 5 et 8.

Il semble probable qu'au cours des processus de polymérisation les groupes phosphoriques secondaires libres s'unissent à d'autres groupements, ce qui expliquerait la variation de pH.

Mais cette expérience préliminaire n'est peut-être pas très significative : il s'agit en effet d'un acide nucléique polydispersé et, de plus, le phénomène de polymérisation s'observe surtout dans la fraction des hauts polymères, fraction qui ne représente qu'un faible pourcentage de l'A. R. N. total dans cet échantillon.

Nous avons donc pensé que si nous réussissions à isoler les hauts polymères des solutions témoin et pressée d'acide nucléique polydispersé, nous pourrions mettre en évidence, de façon plus nette, la divergence entre les courbes d'électrotitration.

Le protocole de cette nouvelle expérience est le suivant :

L'A. R. N. (échantillon N₃) est dissous, à la concentration de 10 mg/ml, dans le tampon phtalate M/5 de pH 4,2.

Une partie de cette solution est soumise à une pression de 14 000 kg/cm², à 37° C, pendant seize heures, l'autre constitue la solution témoin.

Dans ces deux solutions, nous avons procédé à l'isolement des hauts polymères (fractions précipitables par 1 vol. d'acide acétique) à l'état de sel de sodium.

De toutes façons, les lavages à l'alcool ont éliminé toute trace des sels du tampon.

Le nucléate de sodium ainsi préparé est mis en solution dans de l'eau distillée : 18 mg dans 10 ml. Pour les deux solutions d'acide nucléique, témoin et pressée, nous avons amené le pH à 3,90. Cette valeur constitue le pH de départ. Elle se trouve en dehors de la zone de dissociation de l'acide phosphorique secondaire.

Nous présentons la courbe d'électrotitration « aller » obtenue avec la solution d'acide nucléique pressée et la courbe « retour » après séjour de trente minutes à pH 9,70. Nous utilisons pour le titrage, de la soude et de l'acide chlorhydrique N/12,5. Sur ce même graphique, nous avons tracé les courbes « aller » et « retour » de l'échantillon témoin (fig. 4).

Comme dans nos travaux antérieurs [12, 14] nous avons fixé arbitrairement l'origine des ordonnées sur le graphique d'électrotitration, au point qui correspond à l'abscisse 5,78 pour la courbe « témoin aller ». Il s'agit, ici, d'un simple changement d'ordonnées destiné à faciliter la comparaison avec les courbes présentées dans nos anciens travaux.

En fait, les solutions d'A. R. N. avaient toutes initialement un pH voisin de 5,6. Nous ajoutons en une seule fois la quantité d'acide strictement nécessaire pour abaisser le pH à 3,90, puis aussitôt nous procédions au titrage électrométrique.

On observe sur la courbe :

1° Dès le départ (pH 3,9) une divergence entre les courbes « aller » respectives des échantillons pressé et témoin. Cette divergence s'accuse, à partir de pH 5. Elle s'accroît jusqu'à pH 7,

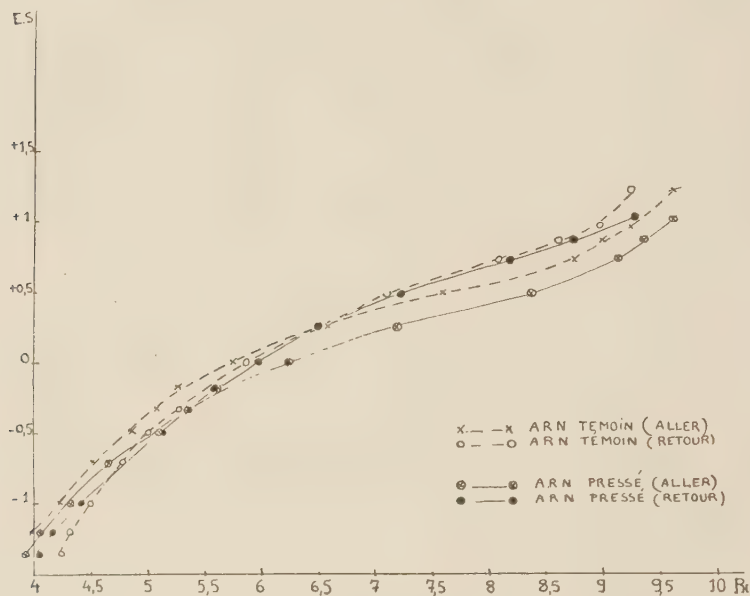


FIG. 4.

puis reste stable par la suite. Aux environs de pH 7, elle correspond à 0,14 Equivalent Soude.

Cette quantité d'E. S. faible est cependant significative ; elle reste très au-delà des erreurs possibles.

En somme, nous avons là un phénomène semblable à celui observé dans l'expérience précédente pour un acide nucléique polydispersé ; mais, ici, l'écart entre les deux courbes est plus grand et sûrement significatif.

2° Lorsque la titration « aller » est terminée (pH 9,70), on abandonne la solution sous azote à la température ordinaire pendant trente minutes. Après les trente minutes de contact avec l'alcali, le pH est tombé de 9,70 à 9,33. On effectue alors le titrage de « retour ». A mesure que l'acide est ajouté la courbe « retour »

se rapproche de la courbe directe ; puis elle la croise vers pH 5,25 et s'en écarte de nouveau, mais, cette fois, en sens inverse : le pH final est 4,10. Le pH de départ était 3,92.

3° En comparant le titrage des échantillons pressé et témoin, on constate que le décalage entre les courbes « aller » et « retour » est plus important dans le cas de la solution nucléique pressée.

En effet, vers pH 8, l'écart entre ces courbes correspond à 0,25 E. S. pour la solution pressée et à 0,15 E. S. pour la solution témoin.

Nous avons interprété ces faits de la façon suivante :

La divergence des courbes de titrage direct des solutions nucléiques pressée et témoin est significative entre 4,5 et 8,5 et confirme le phénomène observé dans l'expérience précédente sur l'A. R. N. polydispersé. La divergence observée ici est plus nette encore, car nous opérons sur la fraction des hauts polymères.

D'autre part, lors de l'électrotitration en retour, nous trouvons bien un phénomène identique (croisement des courbes « aller » et « retour ») à celui déjà noté pour l'acide nucléique témoin [12]. Nous avons interprété ce fait comme la possibilité d'une rupture de liaisons émol-amine entre les bases des nucléotides.

Mais dans le cas de l'échantillon pressé, le déplacement vers des pH inférieurs est plus important que pour l'échantillon témoin.

En somme, *il semble que des liaisons stables acquises au cours de la polymérisation ont fait disparaître un certain nombre de groupes acides.* La présence d'alcali rompt ces liaisons et en libère les groupes acides.

Il est possible que ces liaisons soient du même type que celles qui résistent à la ribonucléase. Il s'agirait donc de liaisons mettant en œuvre des groupes acides phosphoriques secondaires, sensibles aux alcalis, résistantes à la ribonucléase.

La résistance à l'action enzymatique permet de penser qu'il ne s'agit pas de liaisons esters classiques (phosphate-ribose).

Nous avons supposé que certaines des liaisons apparues dans les polymères formés sous pression sont de nature pyrophosphorique (on sait la fragilité aux alcalis dilués du groupement pyrophosphate des ferments de Warburg et von Euler).

Notons qu'il ne s'agit là que d'une hypothèse. Cependant, nous apportons un argument appréciable en présentant les résultats d'une expérience sur le phosphate monopotassique.

Nous avons, en effet, étudié l'influence d'une pression de 14 000 kg appliquée pendant seize heures à 37° C sur une solution de phosphate monopotassique de molarité M/10.

Avant la compression, le pH de la solution était 4,54. Après compression, il est de 4,76.

Nous avons procédé à des électrotitrations sur des solutions témoin et pressée (fig. 5).

Les courbes d'électrotitration qui au départ présentent un écart très net tendent à se rapprocher au fur et à mesure de l'alcalinisation : au-dessus de pH 5,75, les deux courbes sont confondues.

Nous proposons l'interprétation suivante : sous pression, se

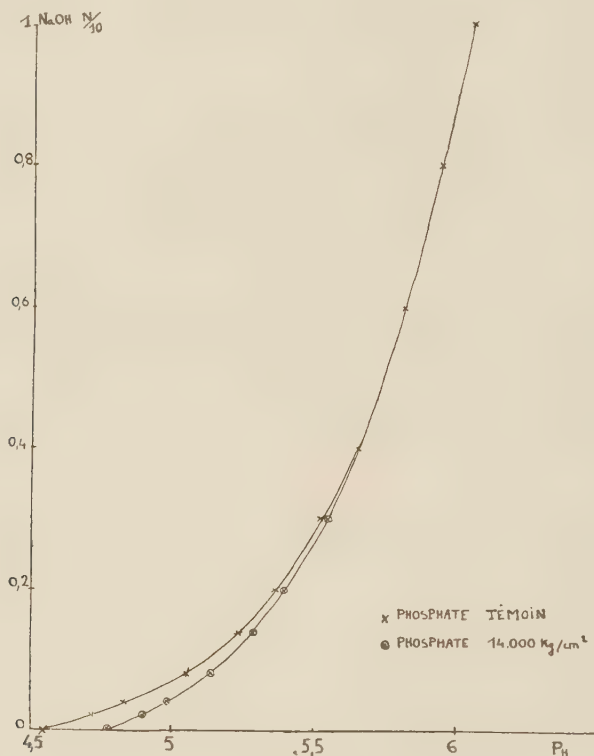


FIG. 5.

formeraient des liaisons pyrophosphoriques entre les groupes acides phosphoriques libres.

Dans la mesure où cette hypothèse est valable, nous pensons que la modification du pH pendant la compression peut être considérée comme la conséquence de la formation de liaisons pyrophosphoriques.

Cette action de la pression sur la formation de liaisons pyrophosphoriques à partir d'orthophosphates minéraux tend à confirmer l'existence de liaisons du même type dans les polymères d'A. R. N. apparus sous pression.

CONCLUSIONS.

Si l'on soumet une solution d'acide ribonucléique à des pressions hydrostatiques très élevées, on fait apparaître des polymères nouveaux formés de nucléotides unis par des liaisons de types divers.

La plupart de ces liaisons sont extrêmement instables et disparaissent dès que la pression est relâchée.

D'autres, moins nombreuses, sont caractérisées par une stabilité assez grande à la pression ordinaire, à un pH voisin de la neutralité, par leur résistance à l'action de la ribonucléase, par leur sensibilité aux alcalis dilués. Il semble s'agir de liaisons mettant en œuvre des groupes acides phosphoriques secondaires.

Nous avons suggéré la possibilité de liaisons pyrophosphoriques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. BRIDGMANN et J. CONNANT. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1919, **15**, 680.
- [2] J. CONNANT et C. TONGBERG. *J. Amer. chem. Soc.*, 1930, **52**, 1659 ; 1932, **54**, 629.
- [3] R. SHAPIRO, R. LISTEAD, D. NEWIT. *J. Chem. Soc.*, 1937, 1784.
- [4] B. RAISTRICK, R. SHAPIRO, D. NEWIT. *J. Chem. Soc.*, 1939, 1761.
- [5] P. BRIDGMANN. *J. biol. Chem.*, 1914, **19**, 511.
- [6] J. BASSET, M. MACHEBOEUF et G. SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **197**, 796.
- [7] E. BARBU, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Ces Annales*, 1948, **75**, 56.
- [8] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 306.
- [9] P. VIGNAIS. Thèse de doctorat en médecine (mai 1952).
- [10] P. VIGNAIS, E. BARBU, J. BASSET, M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2364.
- [11] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64.
- [12] P. VIGNAIS. Structure de l'A. R. N. *Ces Annales*, 1953, **85**, 348.
- [13] M. KUNITZ. *J. gen. Physiol.*, 1940, **24**, 15.
- [14] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953 (sous presse).

INFLUENCE DES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES SUR L'ACTION ENZYMATIQUE DE LA RIBONUCLÉASE (*)

(*Institut Pasteur.*)

En 1947, Bresler [1, 2], s'appuyant sur le principe de Le Chatelier, rechercha l'action des hautes pressions hydrostatiques sur des protéases en présence de leur substrat.

Soumettant ces systèmes à des pressions de l'ordre de 6 000 atm., il affirma avoir pu déplacer l'équilibre enzymatique dans le sens de la synthèse. Il constatait, en effet, sur l'hydrolysats protéique après action de la pression :

- Une augmentation de la viscosité ;
- Une diminution des groupes aminés,
- Et même, à partir d'un hydrolysats ayant perdu sa spécificité antigénique, l'apparition, dans la substance synthétisée sous presse, de l'ancienne spécificité.

Mais l'hypothèse de départ ainsi que les critères sont contestables. En effet, pour que la pression puisse favoriser une synthèse, il faut que le produit occupe un volume plus faible que l'hydrolysats. Or, Linderstrom-Lang [3] a constaté une diminution de volume au cours de l'hydrolyse protéique. Toutefois Samsomov [4] pense que les conditions de pH et la nature du tampon sont des facteurs très importants et que parfois il serait possible d'avoir une contraction au cours de la synthèse. Mais, d'après cet auteur, ce dernier cas ne serait qu'une exception.

D'ailleurs, en solution aqueuse, dans des conditions physiologiques, toute molécule chargée subit une électrostriction de la part des dipôles d'eau. Or, cette électrostriction est plus forte pour les amino-acides que pour la protéine dont ils faisaient partie initialement.

De plus, les travaux expérimentaux de Bresler ont été repris récemment sans pouvoir être confirmés. Machebœuf et coll. [5] ont, en effet, analysé l'influence de la pression sur l'hydrolyse enzymatique des protéines. Se plaçant dans les conditions expé-

(*) Manuscrit reçu le 12 octobre 1953.

riméntales indiquées par Bresler, ils n'ont pas observé de synthèse protéique, mais simplement des modifications de viscosité comme il s'en produit indépendamment de toute action enzymatique lorsque l'on comprime des protéines ou de gros polypeptides. Signalons les recherches de Talwar, Barbu, Basset, Macheboeuf [6] effectuées parallèlement à nos travaux sur la ribonucléase : ces auteurs ont cherché à vérifier d'autres conclusions de Bresler sur la synthèse de l'amidon en comprimant, en présence de l'amylase, les produits d'hydrolyse partielle. Les résultats ont été, là aussi, contraires aux affirmations de Bresler.

Dans tous les cas, l'hydrolyse continue à évoluer avec une vitesse plus ou moins grande suivant la pression.

Cette action des pressions élevées sur la vitesse des réactions enzymatiques a été étudiée du point de vue théorique par divers auteurs [7, 8, 9]. Laidler, en particulier, a montré que les facteurs les plus importants qui influent sur cette cinétique sont : la concentration du substrat mis en œuvre et la pression (des pressions trop élevées pouvant dénaturer irréversiblement certains enzymes).

Dans le système que nous avons étudié (acide ribonucléique de levure-ribonucléase), l'enzyme présente l'intérêt de rester très actif après avoir été soumis, même sans substrat, à des pressions de l'ordre de 12 000 kg/cm².

Nous avons montré précédemment [10] que l'acide ribonucléique de levure peut se polymériser sous l'effet des hautes pressions ; aussi tiendrons-nous compte de ce phénomène dans l'analyse du comportement, sous pression, du complexe enzyme-substrat.

Au cours de nos expériences, nous avons fait varier les facteurs suivants : pression, quantité d'enzyme mis en œuvre.

Utilisant la précipitation fractionnée par l'acide acétique [11], nous avons tenté de mettre en évidence l'influence de ces facteurs sur l'hydrolyse de grands et moyens polymères (1). La précipitation était effectuée sur des fractions aliquotes de solution nucléique à des stades différents de l'hydrolyse. Le précipité est recueilli par centrifugation ; on le dissout dans de l'acide sulfurique concentré et sa teneur en phosphore est estimée par dosage colorimétrique [12].

Première expérience. — Nous mettons en solution dans un tampon phthalate 0,2 M de pH 5,6 un acide nucléique de levure (échantillon N₃) à la concentration de 7,5 mg/ml et de la ribonucléase purifiée à la concentration de 1,25 microgr/ml.

(1) Rappelons que nous désignons arbitrairement par grands polymères (G. P.) la fraction d'acide nucléique précipitant par 1 vol. d'acide acétique et par moyens polymères (M. P.) la fraction précipitant entre 1 et 20 vol. d'acide acétique.

Cette solution est laissée à la température de 37° C pendant trente minutes. On la divise ensuite en deux parties :

La première partie est subdivisée en trois fractions soumises respectivement aux pressions de 14 000, 6 000 et 2 000 kg/cm² pendant cent vingt minutes à 37° C ;

L'autre partie sert de témoin, elle reste à la pression atmosphérique à 37° C.

Le tableau I indique les quantités de phosphore dosé dans les précipités obtenus par action de l'acide acétique sur les solutions pressées et témoin (tableau I, fig. 1 et 2).

TABLEAU I.

	TEMPS écoulé depuis le début de l'hydrolyse	Témoin à la pression atm.		Solution comprimée à 14.000 Kg/cm ²		Solution comprimée à 6.000 Kg/cm ²		Solution comprimée à 2.000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.	H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378						
mise en pression	30 minutes	29	237						
décompression	120 minutes	20	143	43,5	232	32	208	30	128
	130 minutes	-	-	40,5	229	29	201	29	129
	240 minutes	19	123	30	170	25	141		

Les résultats obtenus permettent les conclusions suivantes :

1° L'action d'une pression de 14 000 kg/cm² provoque une augmentation des hauts polymères. Le chiffre de phosphore passe, en effet, de 29 microgrammes pour l'échantillon témoin à 43,5 microgrammes pour l'échantillon qui a été soumis à la compression ; mais ce phénomène a déjà été constaté en l'absence de ribonucléase [10].

Quant aux moyens polymères, leur proportion, avant et après compression, reste sensiblement identique.

D'ailleurs l'hydrolyse reprend dès que l'échantillon est ramené à la pression atmosphérique.

2° A 6 000 kg/cm², le taux en phosphore des hauts polymères est passé de 29 à 32 microgrammes. Là aussi, se serait donc produite une polymérisation banale non enzymatique. Par contre, la proportion des moyens polymères a sensiblement diminué puisqu'elle est passée de 237 à 208 microgrammes de phosphore. L'hydrolyse des moyens polymères subit par conséquent une inhibition moins grande à 6 000 kg/cm² qu'à 14 000 kg/cm².

3° A 2 000 kg/cm², il n'y a pas non plus de variation sensible des hauts polymères ; mais nous notons une baisse très nette des moyens polymères (de 237 à 128 microgrammes de phosphore).

Ainsi, l'hydrolyse enzymatique des moyens polymères se poursuit sous des pressions inférieures à 6 000 kg/cm². Cette hydrolyse est d'autant plus rapide que la pression est plus basse. Notons qu'à 2 000 kg/cm² elle évolue plus vite que pour le

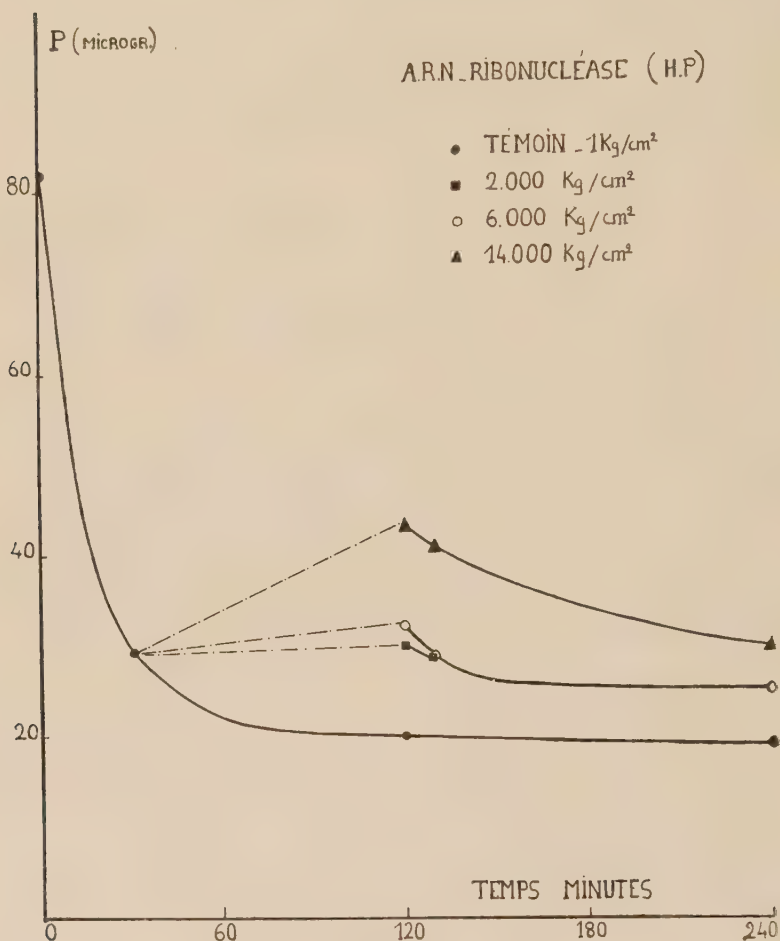


FIG. 1.

témoin (143 microgrammes de phosphore dans les moyens polymères de l'échantillon pressé et 128 dans ceux de l'échantillon témoin).

Toutefois, après retour à la pression atmosphérique, l'hydrolyse de ces moyens polymères n'évolue plus ; elle a déjà atteint

une limite qui est du même ordre de grandeur que celle atteinte par l'hydrolyse d'une solution nucléique témoin laissée à la pression atmosphérique.

Pour compléter ces premiers résultats, il était intéressant d'opérer avec des quantités plus faibles d'enzyme.

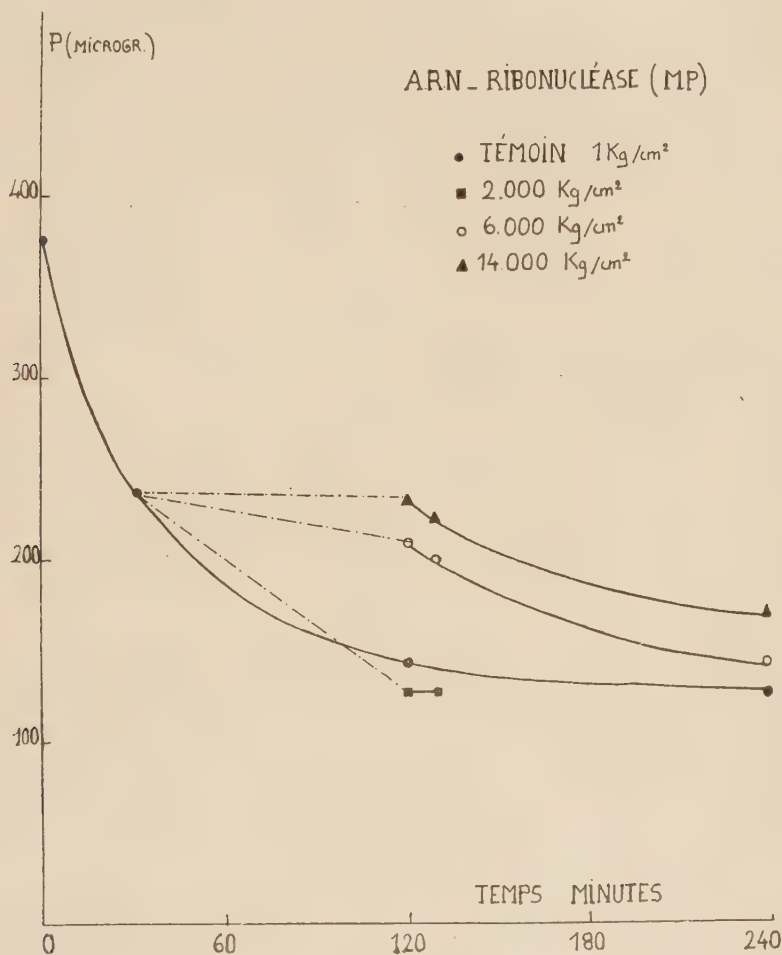


FIG. 2.

Deuxième expérience. — Le protocole est identique à celui de l'expérience précédente. Seule varie la proportion de ribonucléase : nous l'utilisons ici à la concentration de 0,125 microgr/ml.

L'hydrolyse évolue moins vite que précédemment, la quantité

d'enzyme étant plus faible. Il nous a été ainsi possible de comprimer la solution nucléique à un stade plus précoce de

TABLEAU II.

	TEMPS	Témoin resté à la pression atm.		Solution comprimée à 6.000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378	42,5	264,5
mise en pression	30 minutes	41	339		
décompression	105 minutes	25	255		

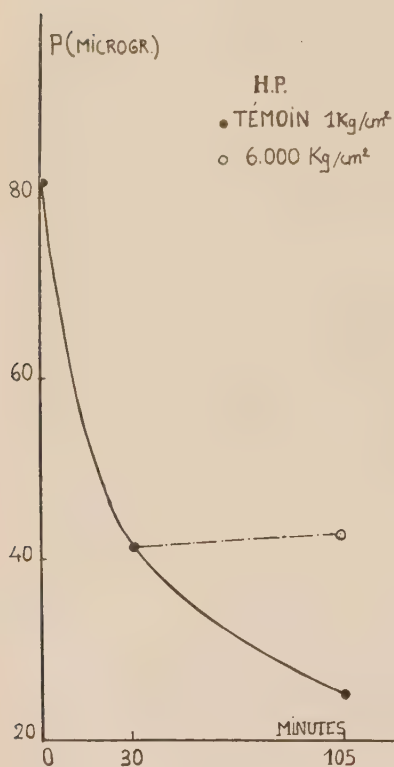


FIG. 3.

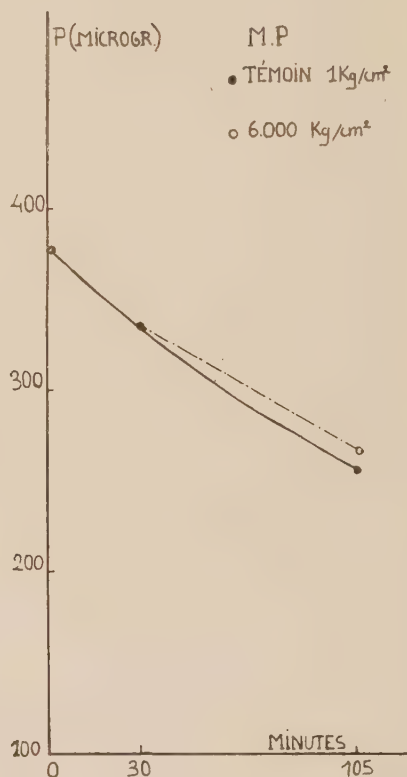


FIG. 4.

l'hydrolyse. La pression, mise en œuvre, était de 6 000 kg/cm².

En comparant les échantillons pressé et témoin (tableau II, fig. 3 et 4), nous constatons qu'il n'y a pas de changement notable dans

la quantité des hauts polymères. Par contre, dans les moyens polymères, la teneur en phosphore passe de 339 à 264,5 microgrammes. Si l'on se rapporte à l'expérience précédente, on peut conclure que l'hydrolyse sous pression des moyens polymères est d'autant plus importante que la solution a été comprimée à un stade plus précoce de son hydrolyse.

Troisième expérience. — Nous avons, cette fois, utilisé une concentration en ribonucléase relativement élevée : 50 microgr/ml.

L'hydrolyse est alors très rapide et, à la huitième minute, au moment de la compression, elle est presque arrivée à sa limite. La solution d'A. R. N. a été comprimée à 14 000 kg/cm² pendant soixante minutes.

On note, dans ces conditions, une augmentation dans la proportion des hauts polymères et une hydrolyse des moyens polymères (voir tableau III et fig. 5 et 6).

TABLEAU III.

	Temps écoulé depuis le début de l'hydrolyse	Témoin resté à la pression atm.		Solution comprimée à 14. 000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378	30	90
mise en pression	8 minutes	23,5	97		
sortie de presse	60 minutes	20,5	86		

RÉSUMÉ.

De ces recherches nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

1° Des pressions très élevées inhibent l'action de la ribonucléase sur l'acide ribonucléique de levure. Mais cette inhibition ne dure que le temps de la compression. Dès que celle-ci est relâchée, l'hydrolyse reprend sa marche.

2° Sous des pressions de 6 000 kg/cm² ou de 2 000 kg/cm², l'hydrolyse enzymatique se poursuit de façon notable pour les moyens polymères, mais reste inhibée pour les hauts polymères.

Sous 2 000 kg/cm², l'hydrolyse des moyens polymères est nettement accélérée et dépasse même la vitesse d'hydrolyse à la pression atmosphérique; toutefois, la limite atteinte dans les deux cas reste du même ordre de grandeur.

En somme, de l'ensemble de ces faits se dégagent deux points essentiels :

1° Dans le cas du système A. R. N.-ribonucléase, la pression ne favorise pas le déplacement de l'équilibre enzymatique vers la synthèse.

2° Dans une solution polydispersée d'A. R. N. soumise à la

compression (en particulier pour $2\,000\text{ kg/cm}^2$), les moyens polymères présentent une nette sensibilité à l'hydrolyse enzymatique contrairement aux hauts polymères. Or, fait curieux, ceux-ci, à la pression atmosphérique, sont attaqués plus rapidement (voir mémoire antérieur [41]).

Deux interprétations de ce phénomène sont possibles : les hauts

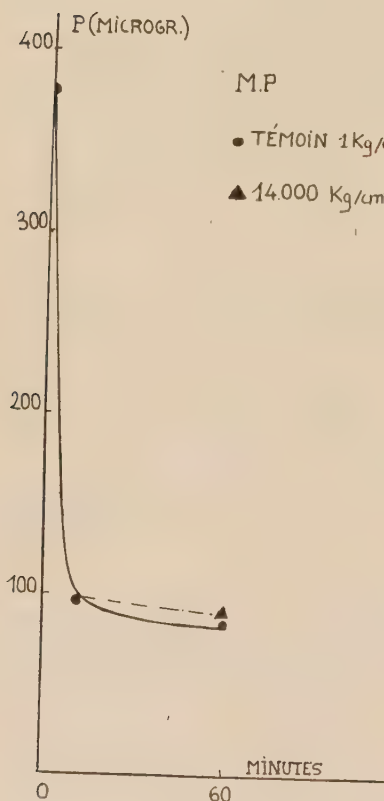


FIG. 5.

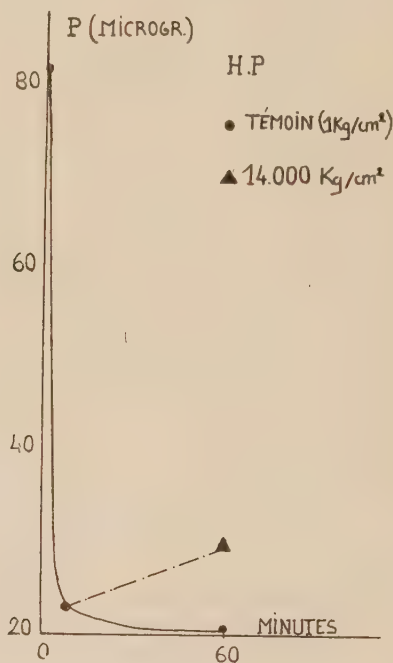


FIG. 6.

polymères peuvent, soit jouer un rôle d'inhibition compétitive dans l'hydrolyse des moyens polymères, soit, au cours d'une étape intermédiaire de leur dégradation, libérer des polynucléotides de même poids moléculaire que les moyens polymères présents dans la solution polydispersée initiale. Ce dernier processus expliquerait l'accumulation des moyens polymères et le ralentissement de l'hydrolyse. Il rendrait compte, d'autre part, des résultats fournis par les hautes pressions : la dégradation

enzymatique des hauts polymères étant stoppée, l'hydrolyse des moyens polymères s'effectue alors normalement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. E. BRESLER et V. L. GLIKINA. *Biochimia*, 1947, **12**, 389.
- [2] S. E. BRESLER, V. L. GLIKINA, A. P. KONIKOV, N. A. SELEZNEVA et P. A. FINOGENOV. *Izvest Akad. Nauk, S. S. S. R. Ser. Fiz.*, 1949, **43**, 392.
- [3] K. LINDERSTROM-LANG et C. F. JACOBSEN. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg (série chimique)*, 1941, **24**, 1.
- [4] G. V. SAMSOMOV. *Biochimia*, 1949, **14**, 113.
- [5] M. MACHEBOEUF, J. BASSET, E. BARBU, M. LE SAGET et G. NUNEZ. *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18**, 471.
- [6] G. TALWAR, E. BARBU, J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1649 et 1793.
- [7] H. EYRING et J. MAGEE. *J. Cell comp. Phys.*, 1942, **20**, 169.
- [8] F. JOHNSON, H. EYRING et R. W. WILLIAMS. *J. Cell comp. Phys.*, 1942, **20**, 247.
- [9] K. LAIDLER. *Arch. Biochem.*, 1951, **30**, 226.
- [10] P. VIGNAIS, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Ces Annales* (sous presse).
- [11] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64.
- [12] M. MACHEBOEUF et J. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 116.

INFLUENCE
DES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES
SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UNE PROTAMINE
EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE
D'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

Nous avons vu précédemment [1] qu'il n'avait pas été possible de mettre en évidence, après action des hautes pressions, une réversibilité de l'hydrolyse enzymatique de l'A. R. N.

Les travaux de Machebœuf et coll. [2] arrivaient aux mêmes conclusions dans le cas d'hydrolysats protéiques. Ces résultats étaient en opposition avec ceux de Bresler [3].

Nous nous sommes demandé si cette contradiction ne pouvait pas s'interpréter de la façon suivante : une véritable synthèse de protéine aurait bien lieu sous pression comme le croit Bresler, mais, dans ces conditions, la protéine ne serait pas stable et elle subirait à la sortie de presse une hydrolyse rapide.

Pour élucider ce problème, il devenait nécessaire de mettre en évidence cette synthèse hypothétique pendant la compression même. La méthode la plus simple était d'utiliser un réactif capable de fixer cet état métastable.

Or, on sait que l'acide nucléique jouit de la propriété de se combiner aux protéines basiques sous forme de complexes précipitables. Au cours de nos essais, nous avons observé un fait intéressant : si, aux divers stades d'hydrolyse, on précipite des volumes semblables d'un hydrolysats de protéine basique par un volume donné d'une solution d'acide nucléique, on met en évidence une précipitation d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. Il devenait ainsi possible de différencier dans un hydrolysats protéique soumis à la pression une réversibilité d'équilibre enzymatique en éliminant de la réaction, dès leur formation, les produits de polymérisation éventuels des peptides.

Nous pensions, en outre, éviter les dépolymérisations enzymatiques rapides qui pouvaient se produire à la sortie de la presse.

I. ETUDE DES COMBINAISONS D'A. R. N.
ET DES PRODUITS D'HYDROLYSE DES PROTAMINES.

Les associations entre acides nucléiques et protamines furent découvertes par Miescher en 1897 [4]. Les protamines sont considérées comme de grands polypeptides composés d'une forte proportion d'acides aminés basiques, parmi lesquels l'arginine est prédominant. Le groupement guanidinium de ce dernier leur confère une basicité élevée : il n'entre pas, en effet, dans la liaison peptidique. A côté de l'arginine existent d'autres acides aminés basiques et quelques mono-acides mono-amminés. La cystéine, la méthionine, le tryptophane et les acides dicarboxyliques font défaut dans la protamine que nous avons utilisée : la salmine. Dans cette substance il existe environ une molécule de mono-acide mono-amminé pour deux molécules d'arginine. Sa composition a été déterminée par Tristram [5] ; elle comprendrait les 58 résidus suivants : 40 molécules d'arginine, 1 d'isoleucine, 2 de valine, 4 de proline, 3 de glycine, 1 d'alanine, 7 de sérine. Son poids moléculaire est de 8 000.

Lorsque le pH est convenable, les protamines peuvent se combiner soit avec les protéines acides, soit avec les acides nucléiques pour former des complexes insolubles [6, 7].

De quelle nature sont les liaisons qui unissent acides nucléiques et protamines ? Elles peuvent se rompre sous l'action de solutions salines concentrées : il s'agirait donc là de liaisons électrovalentes ; des forces électrostatiques exerceraient une attraction entre des groupes phosphoryles de l'acide nucléique et des groupes chargés positivement de la partie protéique (groupe ϵ -aminé de l'arginine par exemple). Cependant, les liaisons entre acides nucléiques et protéines non basiques dans les nucléo-protéines natives sont d'une stabilité plus élevée. Dans ce cas l'alcali agirait sur des liaisons apolaires et son mode d'action s'effectuerait de différentes manières :

- 1° Hydrolyse d'une liaison ester ;
- 2° Dénaturation de la protéine et nouvel arrangement intramoléculaire ;
- 3° Formation pour la protéine d'un anion qui repousse l'anion similairement chargé [8].

ESSAIS EXPÉRIMENTAUX. — Ces essais nous ont montré qu'il était possible de suivre, grâce à la précipitation par l'acide nucléique, la marche de l'hydrolyse de la salmine. L'enzyme hydrolysant était de la trypsine (Etablissements « LTD British Drug Houses »). Nous l'avons purifiée de la manière suivante : après l'avoir mise en suspension dans de l'eau bidistillée légèrement acidifiée (pH 3) nous avons recueilli la partie soluble par

filtration : cet extrait a été lyophilisé. La trypsine ainsi préparée se dissout très facilement dans l'eau et possède une notable activité protéolytique.

Nous avons utilisé de la salmine commerciale (Etablissements Hofmann-Laroche) en solution dans un tampon phtalate de pH 5,6 et de force ionique 0,063 ; le pH final après dissolution est, dans ces conditions, de 5,68. Ce même tampon sert à dissoudre notre A. R. N. [échantillon N₂] (1).

a) Dans un premier essai nous avons recherché de quelle façon variait la quantité de précipité de nucléoprotamine lorsque, à un même volume de solution de protamine, nous ajoutons des volumes croissants de solution d'acide ribonucléique.

La concentration choisie était la même pour la salmine et l'A. R. N. : 5 mg/ml.

Nous répartissons 0,2 ml de solution de salmine dans 5 tubes ; puis dans chacun nous ajoutons des volumes différents de solution d'A. R. N. Ces volumes s'échelonnent entre 0,1 et 5 ml : le rapport $\frac{\text{A. R. N.}}{\text{protamine}}$ varie ainsi de 0,5 à 25. Par addition d'eau distillée nous amenons le volume final à 5,2 ml. La formation du précipité de nucléoprotamine est appréciée par opacimétrie au moyen de l'électrophotomètre de Meunier avec l'écran rouge orangé.

TABLEAU I (*).

Millilitres de solution de protamine .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Millilitres de solution d'A. R. N. . . .	0,1	0,2	0,5	3	5
A. R. N.					
protamine	0,5	1	2,5	15	25
Turbidité.	36	60	129	195	200

(*) Les chiffres indiqués dans le tableau correspondent aux divisions du tambour du photomètre.

En somme, la masse de précipité n'augmente plus lorsque le rapport $\frac{\text{A. R. N.}}{\text{protamine}}$ dépasse 15. A ce moment une faible variation dans la quantité d'A. R. N. ajouté intervient très peu dans la précipitation. Par contre, une légère variation dans les proportions de protamine pourrait facilement être mise en évidence.

C'est dans ces conditions que nous nous sommes placés. Pratiquement, nous avons choisi le mode de précipitation suivant :

(1) Notons que le pH que nous avons choisi n'est certes pas optimum pour l'activité tryptique ; il permet néanmoins une hydrolyse convenable tout en étant compatible avec une bonne stabilité de l'A. R. N.

1 volume de solution de protamine pour 20 volumes de solution d'A. R. N.

b) Dans une deuxième expérience nous avons montré que certains produits d'hydrolyse partielle de la salmine par de la trypsine peuvent entrer en liaison avec des polynucléotides pour former des combinaisons insolubles. De temps à autre, au cours de l'hydrolyse, nous prélevons un volume de l'hydrolysât et nous

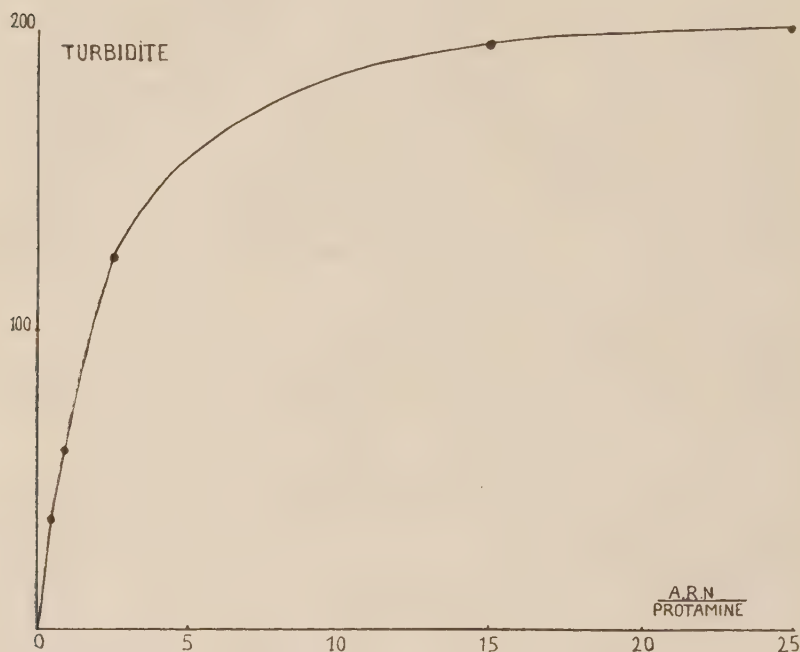


FIG. 4.

ajoutons 20 volumes de solution nucléique. Dans le cas présent, à 0,25 ml de solution de salmine, nous ajoutons 5 ml de solution nucléique. Les suspensions ainsi obtenues sont divisées en trois fractions qui servent respectivement :

A la mesure de turbidité ;

Au dosage d'azote ;

Au dosage de phosphore.

Le phosphore et l'azote étaient dosés dans le précipité recueilli par centrifugation de 2 ml de suspension. Nous rapportons dans le tableau II les chiffres de phosphore et d'azote qui caractérisent la quantité de précipité, c'est-à-dire la marche de l'hydrolyse.

Ces valeurs sont exprimées en microgrammes et correspondent à 5,25 ml de solution.

Dans une colonne spéciale nous avons inscrit les mesures d'opacité.

TABLEAU II.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	MICROGRAMMES d'azote	MICROGRAMMES de phosphore	OPACITÉ
0	208	82	145
25	110	41	56
120	86	32	10

On note un excellent parallélisme entre les variations du phosphore et celles de l'azote. Par contre, l'opacimétrie, comme il fallait s'y attendre, n'est qu'un moyen approximatif d'appréciation de l'abondance du précipité ; mais ce test suffira pour la plupart des essais ultérieurs.

Les quantités d'azote du tableau II correspondent à la somme de l'azote de l'acide nucléique et de l'azote de la salmine ; connaissant les teneurs en phosphore de l'acide ribonucléique, nous pouvons facilement calculer les quantités respectives d'azote de la salmine et de l'A. R. N. Les résultats obtenus sont exprimés en microgrammes d'azote (tableau III).

D'après les proportions théoriques de phosphore dans les nucléotides : 9,6 p. 100, et d'azote dans la protamine : 32 p. 100, nous pouvons connaître la proportion des nucléotides qui entrent en combinaison avec la protamine : 854 microgrammes d'A. R. N.

TABLEAU III.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	MICROGRAMMES d'azote dans la protamine	MICROGRAMMES d'azote dans l'A. R. N.
0	68,6	139,4
25	40,3	69,7
120	31,6	54,4

pour 210 microgrammes de protamine avant l'hydrolyse. Dans ces proportions, tous les groupes aminés de la protamine seraient combinés à des groupes acides phosphoriques de l'acide nucléique. Il existe en quelque sorte une « saturation » de la protamine par l'A. R. N.

D'autre part, nous constatons qu'au cours de l'hydrolyse de la

salmine, la proportion d'A. R. N. qui se combine pour former un précipité est d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. L'A. R. N. présente donc une affinité pour les molécules de salmine intactes ou tout au moins peu modifiées par hydrolyse. Par conséquent, si *sous l'influence de la pression* se produisait une réversibilité dans l'hydrolyse protéique, les grosses molécules synthétisées seraient à ce moment fixées par l'A. R. N. Ce fait intéressant nous a permis de suivre la marche d'une hydrolyse enzymatique de protamine sous pression et dans des conditions normales.

II. — ETUDE DE L'HYDROLYSE DE SOLUTIONS DE SALMINE SOUMISES AUX ULTRAPRESSIONS EN PRÉSENCE ET EN L'ABSENCE D'A. R. N.

EXPÉRIENCE I. — La protamine est dissoute dans la proportion de 5 mg/ml ; la trypsine est introduite dans le liquide à la concentration de 0,1 mg/ml.

Après soixante minutes d'hydrolyse nous prélevons une partie aliquote d'hydrolysats que nous comprimons à 14 000 kg/cm² pendant trois heures à 37° C.

Une autre partie de l'hydrolysats est additionnée d'acide nucléique dans les proportions suivantes : 1 volume de solution de protamine pour 20 volumes de solution d'acide nucléique à 5 mg/ml. Une fraction de cette suspension est soumise également à 14 000 kg/cm².

Pendant que sont comprimés l'hydrolysats de protamine et la solution de nucléoprotamine, des échantillons restent à la pression atmosphérique à une température de 37° C. Ces échantillons ont été, eux aussi, enfermés dans des sacs de caoutchouc identiques à ceux qui sont mis en presse. Nous avons, en effet, constaté le rôle important de certains facteurs tels que l'oxygène ou les agents réducteurs sur la variation de turbidité des précipités du nucléoprotamine (2).

Nous avons, par ailleurs, soumis un échantillon de solution

(2) A titre d'exemple, voici les résultats de mesures opacimétriques pour un mélange d'A. R. N. et de salmine partiellement hydrolysée après une heure de séjour dans des conditions diverses :

A l'air :

Sans hydroquinone.	46
Avec hydroquinone.	57

En sac de caoutchouc :

Sans hydroquinone.	31
Avec hydroquinone.	38

Ce fait inattendu mériterait une étude particulière.

nucléique pendant trois heures à 14 000 kg/cm². Nous avons effectué une précipitation d'un hydrolysate de protamine (soixantième minute) par cet acide ribonucléique : ceci constituait en quelque sorte un témoin et permettait d'apprécier la part qui revenait à l'acide nucléique comprimé dans les variations de la combinaison de nucléoprotamine sous les hautes pressions.

En somme, grâce à la précipitation par l'A. R. N., on apprécie la marche de l'hydrolyse de la salmine à la pression atmosphérique et sous les hautes pressions. Le tableau IV donne le résultat des mesures opacimétriques (graduations lues sur le tambour de l'électrophotomètre de Meunier).

TABLEAU IV.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	HYDROLYSAT de protamine Témoin	HYDROLYSAT de protamine 14 000 kg/cm ²	HYDROLYSAT de protamine + A. R. N. 14 000 kg/cm ²
0	198		
8	80		
30	41		
Mise en pression. . . 60	20	20	20
Décompression . . . 240	3	13	30

D'autre part, la solution d'acide nucléique comprimée pendant trois heures à 14 000 kg/cm² précipite plus nettement l'hydrolysate de protamine (soixantième minute d'hydrolyse) que la solution d'acide nucléique non comprimée. Les valeurs opacimétriques sont 31 pour l'échantillon comprimé et 20 pour le témoin. Ce phénomène pourrait être rapproché de celui constaté lors de la précipitation par l'acide acétique de solutions d'A. R. N. comprimée [9].

En conclusion, l'hydrolyse de la solution de protamine en l'absence d'acide ribonucléique évolue moins rapidement à 14 000 kg/cm² qu'à la pression atmosphérique. En effet, en cent quatre-vingts minutes le chiffre de turbidité est passé de 20 à 3 pour l'échantillon laissé à la pression atmosphérique, tandis que pour celui qui a été soumis pendant le même temps à 14 000 kg/cm² cette valeur est passée de 20 à 13 seulement.

La suspension de nucléoprotamine, qui a été soumise à 14 000 kg/cm² présente à la sortie de presse un degré d'opacité plus élevé qu'avant compression (30 au lieu de 20). Ce résultat pourrait en imposer pour une resynthèse de l'hydrolysate de protamine. Mais il semble uniquement en relation avec le fait que

l'A. R. N., après compression, possède la propriété de former des précipités plus abondants de nucléoprotamine.

EXPÉRIENCE II. — Les pressions mises en œuvre ici sont 1 850 kg/cm² et 6 000 kg/cm². Nous avons recherché l'influence de telles compressions sur des hydrolysats de protamine arrivés

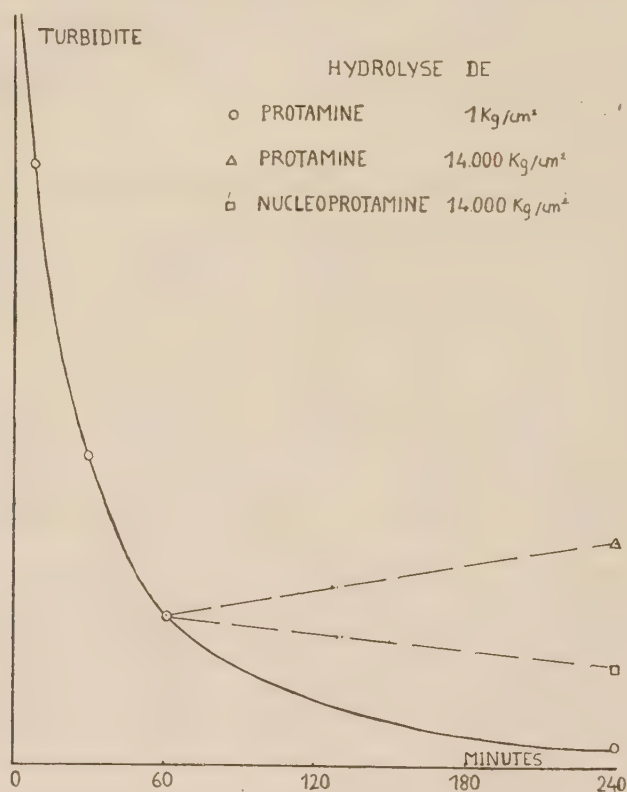


FIG. 2.

à un stade moins avancé que dans l'expérience précédente. Les concentrations d'acide nucléique et de salmine étaient de 3 mg/ml, celle de trypsine de 0.05 mg/ml. Par ailleurs, le protocole expérimental reste le même. Les résultats sont notés dans le tableau V.

De même que dans l'expérience I, nous avons comprimé indépendamment deux échantillons de la solution d'A. R. N. à 6 000 kg/cm² et à 1 850 kg/cm² pendant deux heures. Nous les avons ajoutés à l'hydrolysate de salmine (trentième minute). Les valeurs opacimétriques qui rendent compte de la formation de

TABLEAU V.

TEMPS D'HYDROLYSE en minutes	HYDROLYSAT de protamine témoin	HYDROLYSAT de protamine		HYDROLYSAT de protamine + A.R.N.	
		1 850 kg/cm ²	6 000 kg/cm ²	1 850 kg/cm ²	6 000 kg/cm ²
0	114				
3	78				
Mise en pression 35	36	36	36	36	36
Décompression 180	2	6	18	23	26

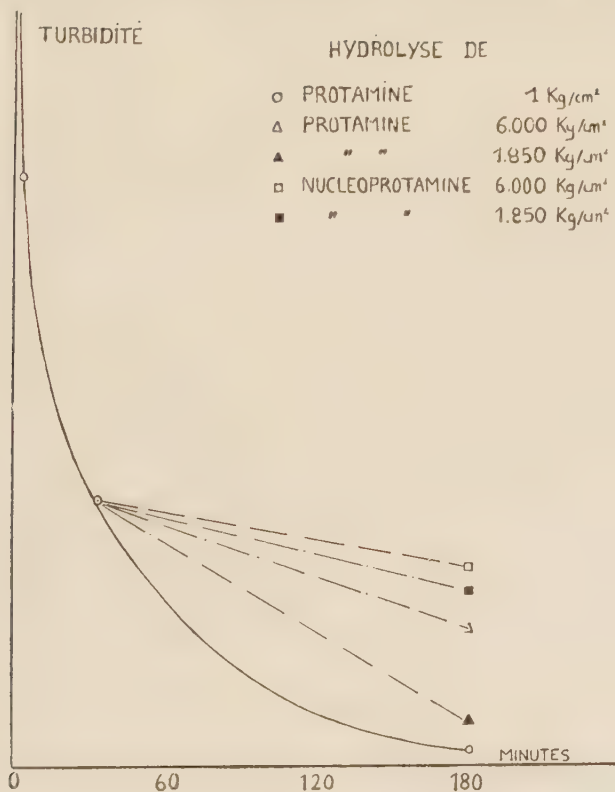


FIG. 3.

nucléoprotamine sont de 36 pour 1 850 kg/cm², 37 pour 6 000 kg/cm² et 36 pour la solution nucléique restée à la pression atmosphérique. Les précipités obtenus sont donc du même ordre de grandeur dans les différents cas. Notons que ce résultat diffère de celui obtenu dans la première expérience pour une pression beaucoup plus forte : 14 000 kg/cm².

Les résultats du tableau V nous amènent aux conclusions suivantes :

L'hydrolyse de la salmine en absence d'A. R. N. continue de progresser sous pression. La vitesse de l'hydrolyse est d'autant plus faible que la pression est plus élevée. Dans tous nos essais elle est inférieure à la vitesse d'hydrolyse à la pression atmosphérique.

Les suspensions de nucléoprotamine soumises à des pressions de 6 000 kg/cm² et 1 850 kg/cm² subissent une légère diminution d'opacité. Ceci peut être interprété comme le résultat d'une attaque enzymatique de la salmine, même combinée à l'acide ribonucléique. Cette hydrolyse est cependant nettement moins marquée qu'en absence d'A. R. N.

RÉSUMÉ.

Nous avons recherché l'influence des hautes pressions sur l'évolution de l'hydrolyse d'une protamine : la salmine. La méthode utilisée pour apprécier l'état d'hydrolyse consiste à stopper cette hydrolyse par addition d'A. R. N. La quantité de précipité de nucléoprotamine formée est d'autant plus faible que l'hydrolyse est plus avancée. Les résultats obtenus indiquent que l'hydrolyse enzymatique de la salmine continue d'évoluer sous pression.

Mais ces résultats n'excluaient pas la formation, sous pression, de produits de synthèse sous un état instable ; pour mettre en évidence ces produits éventuels, il était nécessaire de les fixer sous une forme stable. Nous avons montré l'affinité de l'A. R. N. pour les molécules de protamine peu ou pas hydrolysées. Ainsi, si l'on soumet à la pression un hydrolysât de protamine en présence d'A. R. N., les molécules protéiques resynthétisées doivent se combiner immédiatement à l'A. R. N. et donner un précipité de nucléoprotamine. Par ce procédé nous n'avons pas pu mettre en évidence la synthèse, sous les hautes pressions, de protéines à partir d'un hydrolysât. Ces résultats contredisent les affirmations de Bresler.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. VIGNAIS et M. MACHEBOEUF. Ces *Annales*, 1953 (*sous presse*).
- [2] M. MACHEBOEUF, J. BASSET, E. BARBU, LE SAGET, NUNEZ. *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **48**, 471.

- [3] S. E. BRESLER et V. L. GLIKINA. *Biochimia*, 1947, **12**, 389.
 - [4] MIESCHER. *Die histochemischen und physiologischen Arbeiten*, Vol. II, Leipzig, 1897.
 - [5] TRISTRAM. *Nature*, 1947, **160**, 637.
 - [6] LISSITZIN et ALEXANDROWSKAJA. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1933, **221**, 156.
 - [7] KOSSEL. *The protamines and Histones*, London, 1928.
 - [8] A. BOIVIN. *Exp. Bioch. med.*, 1944, **4**, 7.
 - [9] P. VIGNAIS. *Ces Annales (sous presse)*.
-

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons essayé de dégager quelques données élémentaires sur la structure de l'acide ribonucléique. Le schéma classique de l'unité tétranucléotidique se répétant comme un motif tout au long de la molécule nucléique n'est plus admis à l'heure actuelle. Des travaux expérimentaux récents ont montré en effet que la séquence des nucléotides à l'intérieur de la molécule nucléique est beaucoup plus complexe : la molécule d'A.R.N. serait formée d'un noyau central de nucléotides puriques, les extrémités de la chaîne moléculaire étant beaucoup plus riches en nucléotides pyrimidiques.

Au cours de nos recherches, nous avons tenté de différencier de façon pratique les polymères de différente taille dans une solution polydispersée d'acide nucléique. Nous avons utilisé une méthode de précipitation fractionnée par l'acide acétique. Les différentes catégories de polymères obtenus sont désignées arbitrairement sous le nom de grands, moyens et petits polymères. En appliquant cette méthode à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de l'A.R.N., il est possible d'apprécier une différence entre les vitesses d'action de la ribonucléase sur les fractions nucléiques de différents poids moléculaires : les hauts polymères sont attaqués plus rapidement. Ce mode d'action particulier de la ribonucléase laissait prévoir une grande diversité dans la nature des liaisons nucléotidiques.

Des courbes d'électrotitration effectuées avant et après hydrolyse enzymatique dans différentes conditions sont en faveur de liaisons primaires de natures différentes ; à côté de la liaison ester classique peuvent exister des liaisons phosphates d'énol ou d'amine ainsi que des liaisons pyrophosphates. Malgré leur nombre restreint, ces derniers types de liaisons n'en possèdent pas moins une importance capitale. Elles rendraient compte en partie de la variété et de la spécificité des acides nucléiques.

D'autre part, certains faits (action du pH, de la force ionique, de la ribonucléase) laissent penser à l'existence de liaisons secondaires dans l'acide nucléique de levure. Ces liaisons, peut-être du type pont hydrogène, uniraient des groupes énels et amines des bases azotées.

Nous avons, par la suite, envisagé les modifications subies par des solutions d'A.R.N. soumises à l'action de pressions hydrostatiques très élevées. Elles se traduisent par une augmentation de la proportion des hauts polymères. Une grande partie de ces polymères néoformés est instable dès que la pression est relâchée. Seule, une faible proportion reste stable, ainsi qu'en témoignent les mesures de viscosité. Les études enzymatiques et les données de l'électrotitration nous ont permis de considérer comme probable l'existence de liaisons pyrophosphoriques dans cette fraction.

A partir de ces notions, nous avons étudié l'influence de la pression sur l'évolution de réactions enzymatiques, plus spécialement le cas du système A.R.N.-ribonucléase. Nous avons constaté que, pour des valeurs relativement faibles : $2\,000\text{ kg/cm}^2$, la vitesse d'hydrolyse des moyens polymères est accrue. Dans ces conditions, les moyens polymères présentent donc une nette sensibilité à l'action de la ribonucléase, contrairement aux grands polymères. Or, sous la pression atmosphérique, on observe le phénomène inverse. Par conséquent, des pressions de l'ordre de $2\,000\text{ kg/cm}^2$ stopperaient électivement la dégradation enzymatique des grands polymères et laisseraient l'hydrolyse des moyens polymères s'effectuer normalement. Pour $6\,000\text{ kg/cm}^2$ et au-dessus, l'hydrolyse est inhibée en totalité pendant la compression ; mais elle reprend dès que la solution nucléique est remise à la pression atmosphérique. De toutes façons, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence, sous l'influence des pressions hydrostatiques, une synthèse de grands polynucléotides à partir d'un hydrolysats : ces faits tendaient à infirmer les résultats de Bresler sur la réversibilité de l'hydrolyse enzymatique par les hautes pressions ; ils n'excluaient pas cependant la formation, dans la presse, de produits de synthèse sous un état instable. Nous avons abordé ce problème dans le cas des hydrolysats protéiques.

Nous avons recherché le comportement de tels hydrolysats en présence d'A.R.N. Dans le cas de protéines basiques telles que les protamines, l'A.R.N. forme une combinaison nucléoprotéinique qui précipite ; or dans des conditions expérimentales bien déterminées, cette combinaison se réalise plus spécifiquement avec les polypeptides de haut poids moléculaire. Dans le cas où des produits de synthèse éventuels de la protamine se formeraient dans la presse, il est logique de penser qu'ils seraient immédiatement fixés sur l'A.R.N. Cette méthode, malgré ses possibilités, ne nous a pas permis d'observer un déplacement de l'équilibre de la réaction enzymatique vers la synthèse sous l'influence des pressions hydrostatiques.

SOMMAIRE (*) (**)

INTRODUCTION.

- I. — Fractionnement des acides ribonucléiques par l'acide acétique.
Description des méthodes.
Application à l'étude de l'action enzymatique de la ribonucléase.
Conclusions.
- II. — Influence des conditions d'action de la ribonucléase sur l'hydrolyse de l'acide ribonucléique.
Concentration d'enzyme.
Température.
pH.
Action de l'hydrolyse alcaline associée à l'hydrolyse enzymatique.
Conclusions.
- III. — Faits en faveur de liaisons de type secondaire dans l'A.R.N.
Résultats fournis par :
Action des alcalis.
Action de la force ionique.
Action de la ribonucléase testée par précipitation acétique de l'A.R.N. ou par libération de fonctions acides.
Conclusions.
- IV. — Comportement physicochimique de l'A.R.N. de levure soumis à l'action des hautes pressions.
 - A. — Mise en évidence d'une polymérisation sous pression.
 - 1° Par précipitation acétique en fonction :
Des conditions de compression ;
De la polydispersion de l'A.R.N. ;
Du pH et de la force ionique du tampon.
 - 2° Par mesures viscosimétriques.

(*) Les références bibliographiques sont portées à la fin de chaque chapitre.

(**) La première page de chacun des différents chapitres est numérotée par le chiffre 1.

B. — Nature de la polymérisation de l'A.R.N. :

- 1° Action de la ribonucléase ;
- 2° Données de l'électrotitration.

Conclusions.

V. — Influence des hautes pressions sur l'action enzymatique de la ribonucléase.

Analyse des résultats en fonction :

De la pression utilisée ;

De la quantité d'enzyme mis en œuvre.

Dissociation de l'action enzymatique sur les polymères de différentes tailles.

Conclusions.

VI. — Influence des hautes pressions sur l'hydrolyse enzymatique d'une protamine en présence et en absence d'A.R.N.

Conditions de précipitation protamine-A.R.N.

Déduction pour l'étude du complexe protamine-trypsine en présence d'A.R.N.

Etude de l'hydrolyse enzymatique d'une protamine sous différentes pressions.

Etudes de cette hydrolyse en présence d'A.R.N. — Influence des divers facteurs de la réaction :

Pression ;

Quantité d'enzyme ;

Précipitabilité de l'A.R.N.

Conclusions.

VII. — Conclusions générales.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

**Méthodes de purification de l'exotoxine diphtérique
et de son anatoxine.**

VU ET APPROUVÉ A PARIS, LE 5 JUIN 1952 :

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Paris,
A. CHATELET.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN SARRAILH.

